

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPACT DE LA POLLUTION AGRICOLE SUR LE MÉTABOLISME
ET LE TRANSPORT DES RÉTINOÏDES CHEZ LES OUAOUARONS
(*RANA CATESBEIANA*) DU BASSIN VERSANT DE LA RIVIÈRE
YAMASKA

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
SÉBASTIEN FILION

MAI 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

AVANT-PROPOS

Mon projet de maîtrise s'inscrit dans une étude plus globale nommée « Projet Ouaouaron de la Yamaska ». Ce programme, mis sur pied par des membres du Centre TOXEN/CIRÉ de l'UQAM, regroupe un ensemble de chercheurs qui s'intéressent à l'impact de la contamination d'origine agricole sur la santé des ouaouarons de la rivière Yamaska, le cours d'eau le plus pollué au Québec. Les objectifs de mon étude étaient d'abord de valider des résultats obtenus dans les années antérieures concernant les profils plasmatique et hépatique des rétinoïdes chez les ouaouarons, puis de vérifier l'impact de la contamination agricole sur les concentrations et la synthèse des protéines de transport du rétinol. Pour doser les rétinoïdes dans le foie et le plasma, j'ai utilisé des méthodes déjà publiées. Cependant, des techniques ont été développées (HPLC et RT-PCR) afin de doser les protéines de transport dans le plasma et d'évaluer leur taux de synthèse hépatique.

Les analyses des rétinoïdes ont permis de confirmer certains résultats obtenus dans les campagnes d'échantillonnage antérieures et aussi, d'établir les bases pour la partie du projet traitant des protéines de transport. Bien que les résultats obtenus dans la seconde partie du projet aient été moins concluants, mon étude a quand même permis de jeter les bases pour développer une méthode de mesure adéquate des protéines de transport au HPLC (Chromatographie liquide à haute performance) et une méthode afin d'évaluer le taux de synthèse de ces protéines en RT-PCR (transcriptase reverse et réaction en chaîne de la polymérase).

Ce document est divisé en quatre chapitres. Dans le chapitre I, j'aborde l'état des connaissances actuelles concernant l'état de santé des amphibiens ainsi que le métabolisme et le transport des rétinoïdes, dans le chapitre II, je décris la méthodologie et le matériel employés et dans le chapitre III, je présente les résultats

concernant les rétinoïdes plasmatique et hépatique. Finalement, dans le chapitre IV, je discute des résultats obtenus.

Les ouaouarons étudiés dans cette recherche proviennent des campagnes d'échantillonnage de 2007 et de 2008, auxquelles j'ai participé avec toute une équipe de terrain. Tous les résultats présentés dans ce document sont le résultat de mes propres expérimentations réalisées dans les laboratoires de Philip Spear (rétinoïdes plasmatique et hépatique ainsi que dosage des protéines de transport dans le sang) et de Catherine Jumarie (taux de synthèse des protéines de transport). Les analyses d'eau pour les pesticides et les nutriments ont été effectuées par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ).

Je tiens à remercier ma directrice de maîtrise, Monique Boily, ainsi que mon co-directeur, Philip Spear, qui m'ont fait confiance pour ce projet et qui m'ont appuyé tout au long de ma maîtrise. Je dois également adresser un merci spécial à Catherine Jumarie, pour l'aide au niveau de l'élaboration de la méthode RT-PCR ainsi que pour son grand soutien pendant le projet, à Robert Moreau, pour son aide précieuse pour la mise au point de la méthode de RT-PCR et à Marc Mantha pour son aide technique au laboratoire. Je voudrais aussi remercier toute l'équipe de terrain et plus particulièrement Marjolaine Bisson qui m'a appris les rudiments de la capture des ouaouarons. Je voudrais également dire un mot tout spécial à tous les gens que j'ai côtoyés au Département de biologie et au laboratoire, plus particulièrement à Janik Thibodeau pour sa compagnie et son soutien pendant les périodes plus difficiles. Finalement, j'aimerais dire merci aux membres de ma famille : ma mère, Monique, mon père, Richard, Andréanne, Geneviève et Fred, pour leur appui tout au long de mes études comme dans tous les projets que j'entreprends, ainsi que pour leur soutien dans les moments les plus difficiles.

En outre, je tiens à préciser que cette maîtrise m'a permis de grandir tant sur le plan scientifique que sur le plan personnel. Les hypothèses que j'ai vérifiées étaient tout à fait nouvelles et aucune étude n'avait été publiée sur le sujet. De plus, le fait de travailler avec des animaux sauvages et non avec des cultures cellulaires a rendu le travail en RT-PCR difficile. Malgré tout, j'ai obtenu des résultats qui permettront de faire des avancées importantes dans le futur et pour la première fois, des données ont été obtenues pour des ouaouarons femelles.

En dernier lieu, il importe de remercier les partenaires financiers impliqués dans cette étude. Ainsi, cette recherche a été réalisée grâce à une subvention à la découverte (CRSNG) octroyée à Monique Boily et à une bourse d'études supérieures du Canada Alexander-Graham-Bell (CRSNG) que j'ai obtenue pour les années scolaires 2007-2008 et 2008-2009.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	ii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
RÉSUMÉ.....	xiii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES	4
1.1 Déclin des populations d'amphibiens à travers le monde	4
1.2 Développement de l'agriculture	6
1.2.1 Évolution de l'agriculture.....	6
1.2.2 Contaminants retrouvés en milieu agricole	6
1.2.3 Effets des contaminants agricoles sur les organismes.....	7
1.3 Les rétinoïdes	10
1.3.1 Description et rôles des rétinoïdes.....	10
1.3.2 Métabolisme des rétinoïdes : de l'absorption au foie.....	14
1.3.3 Impact des polluants agricoles sur le métabolisme des rétinoïdes chez les amphibiens.....	18
1.3.4 Transport du rétinol vers les cellules cibles	19
1.3.5 Impact des contaminants sur les protéines de transport	24

1.4	Objectifs et hypothèses.....	26
1.4.1	Impact sur le métabolisme des rétinoïdes.....	26
1.4.2	Impact sur le transport du rétinol.....	27

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	29
2.1 Approche expérimentale et plan d'échantillonnage	29
2.1.1 Présentation du matériel biologique	29
2.1.2 Présentation des variables biologiques	30
2.1.3 Sites à l'étude	31
2.1.4 Échantillonnage	33
2.2 Méthodes analytiques.....	35
2.2.1 Extraction et détection des rétinoïdes hépatiques.....	35
2.2.2 Extraction et détection des rétinoïdes plasmatiques	36
2.2.3 Extraction et détection de la RBP et de la TTR dans le plasma	37
2.2.4 Extraction de l'ARN du foie et RT-PCR.....	38
2.2.5 Analyses statistiques.....	44

CHAPITRE III

RÉSULTATS	45
3.1 Effectifs (nombre d'échantillons) de l'étude.....	45
3.2 Comparaison mâles/femelles.....	46
3.3 Résultats rétinoïdes 2007	47
3.4 Résultats rétinoïdes 2008	52
3.5 Résultats pour la longueur museau-cloaque (LMC).....	57
3.6 Résultats ratio poids du foie sur LMC	59

3.7	Résultats préliminaires du dosage de la RBP, de la TTR, du complexe Rétinol-RBP et du complexe Rétinol-RBP-TTR dans le plasma.....	60
3.8	Résultats des analyses de RT-PCR effectuées dans le but de vérifier les taux de synthèse hépatique pour la RBP et la TTR.....	74

CHAPITRE IV

DISCUSSION	86
4.1 Analyses d'eau	86
4.2 Rétinoïdes 2007.....	89
4.3 Rétinoïdes 2008.....	95
4.4 Différence entre les sexes.....	100
4.5 LMC 2007 et 2008	103
4.6 Ratio poids du foie sur LMC 2007 et 2008	104
CONCLUSION.....	107
RÉFÉRENCES	111
ANNEXE.....	130

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Structure moléculaire de différents rétinoïdes	11
1.2	Résumé du rôle des rétinoïdes	12
1.3	Apport alimentaire et transport des rétinoïdes au foie	15
1.4	Métabolisme hépatique des rétinoïdes	16
1.5	Filtration glomérulaire du complexe RBP-rétinol et rétention du complexe TTR-RBP-rétinol	21
2.1	Sites à l'étude dans le bassin de la rivière Yamaska	33
3.1	Rétinol plasmatique en fonction des sites pour 2007	48
3.2	Rétinol hépatique en fonction des sites pour 2007	49
3.3	Esters de rétinol hépatiques totaux en fonction des sites pour 2007	50
3.4	Ratio des esters de rétinol totaux sur le rétinol hépatique en fonction des sites pour 2007	51
3.5	Ratio du rétinol plasmatique sur le rétinol hépatique en fonction des sites pour 2007	52
3.6	Rétinol plasmatique en fonction des sites pour 2008	53
3.7	Rétinol hépatique en fonction des sites pour 2008	54
3.8	Concentration des esters de rétinol hépatiques totaux en fonction des sites pour 2008	55

3.9	Ratio des esters de rétinol totaux sur le rétinol hépatique en fonction des sites pour 2008	56
3.10	Ratio du rétinol plasmatique sur le rétinol hépatique en fonction des sites pour 2008	57
3.11	Ratio poids du foie sur LMC en fonction des sites pour 2007	59
3.12	Ratio poids du foie sur LMC en fonction des sites pour 2008	60
3.13	Standard de poids moléculaires (vitesse d'élution de 0,5 ml/min; dilution 1/50; injection 50 µl)	63
3.14	Standard de poids moléculaires (vitesse d'élution de 1,5 ml/min; dilution 1/50; injection 50 µl)	64
3.15	Standard de poids moléculaires (vitesse d'élution de 0,3 ml/min; dilution 1/50; injection 50 µl)	64
3.16	Standard de poids moléculaires (vitesse d'élution de 0,5 ml/min; dilution 1/50; injection 20 µl)	65
3.17	Standard de poids moléculaires (vitesse d'élution de 0,5 ml/min; dilution 1/250; injection 20 µl; saline isotonique comme phase mobile)	66
3.18	Standard de poids moléculaires (vitesse d'élution de 0,5 ml/min; dilution 1/250; injection 20 µl; phase mobile du département de chimie)	67
3.19	Régression linéaire entre le log du poids moléculaire des protéines et le temps de rétention	68
3.20	Standard de RBP	69
3.21	Standard de plasma humain	70
3.22	Plasma de ouaouaron à 280 nm	71
3.23	Plasma de ouaouaron à 330 nm	72
3.24	Standard d'IgG à 280 nm	73
3.25	Extrait d'ARN total de l'échantillon LB #10 de l'année d'échantillonnage 2008	75

3.26	RT-PCR effectué sur l'extrait d'ARN	76
3.27	RT-PCR effectué sur l'extrait d'ARN (conditions modifiées)	78
3.28	RT-PCR effectué sur l'extrait d'ARN (traitement à la DNase)	79
3.29	RT-PCR sur un nouvel extrait d'ARN (traitement à la DNase)	81
3.30	Extrait d'ARN total des muscles et des reins de l'échantillon DS #2 de l'année d'échantillonnage 2008	83
3.31	RT-PCR sur les extraits de reins et de muscles	84

LISTE DES TABLEAUX

Figure	Page
2.1 Produits utilisées lors des réactions de RT-PCR	43
3.1 Effectifs utilisés pour les analyses statistiques	45
3.2 Comparaison entre mâles et femelles à chacun des sites	47
3.3 LMC en fonction des sites	58
A.1 Analyses d'eau de 2007 pour les paramètres physico-chimiques	131
A.2 Analyses d'eau de 2008 pour les paramètres physico-chimiques	131
A.3 Résultats de 2007 pour les pesticides dans l'eau	132
A.4 Résultats de 2008 pour les pesticides dans l'eau	133

LISTE DES ABRÉVIATIONS

apoB	apolipoprotéine B
apoE	apolipoprotéine E
apo-RBP	protéine de liaison au rétinol seule (sans rétinol)
ARAT	Acyl-CoA: rétinol acyltransférase
BPC	biphényles polychlorés
CRBP	protéine de liaison intracellulaire du rétinol (cellular retinol binding protein)
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
DNase	désoxyribonucléase
HER	hydrolase des esters de rétinol
holo-RBP	protéine de liaison du rétinol liée au rétinol
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance (High performance liquid chromatography)
IgG	Immunoglobuline
LMC	longueur museau-cloaque (snout-vent length)
LRAT	lecithin: rétinol acyltransférase
RAR	récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque (retinoic acid receptor)
RBP	protéine de liaison au rétinol (retinol-binding protein)
RaIDH	rétinal déshydrogénase
RoIDH	rétinol déshydrogénase
RNase	ribonucléase
RT-PCR	transcriptase reverse (reverse transcriptase) et réaction en chaîne de la polymérase (polymerase chain reaction)
RXR	récepteur X des rétinoïdes (retinoid X receptor)
T ₃	triiodo-L-thyronine
T ₄	thyroxine
TTR	transthyrétine (protéine de liaison des hormones thyroïdiennes)

RÉSUMÉ

Depuis plusieurs années maintenant, les populations d'amphibiens sont en déclin, et ce, partout sur la planète. Le problème semble engendré par de multiples facteurs agissant de concert tels que le réchauffement climatique, l'augmentation des rayons ultraviolets, l'introduction d'espèces exotiques, l'augmentation des infections parasitaires et, probablement les deux plus importants, l'altération et la contamination de l'habitat. En ce qui concerne la pollution de l'habitat, la contamination d'origine agricole peut affecter grandement les amphibiens vivant à proximité de régions rurales. Avec l'avènement de l'agriculture intensive, sont en effet arrivés les nombreux pesticides que l'on retrouve maintenant dans plusieurs cours d'eau. Les contaminants d'origine agricole peuvent être la cause de nombreux problèmes de santé chez les amphibiens. Chez les grenouilles vivant à proximité de zones agricoles, des malformations sont souvent remarquées. Dès lors, une perturbation de l'homéostasie des rétinoïdes, des molécules notamment impliquées dans le développement embryonnaire, a été soupçonnée. Certaines études démontrent d'ailleurs une altération des concentrations hépatique et plasmatique de ces molécules chez des grenouilles provenant de régions fortement agricoles.

Ainsi, l'objectif de la présente étude était de vérifier si les concentrations plasmatique et hépatique des rétinoïdes étaient affectés par l'agriculture chez les ouaouarons, *Rana catesbeiana*. Pour ce faire, des ouaouarons ont été échantillonnés au cours des étés 2007 et 2008 à différents sites du bassin versant de la rivière Yamaska sélectionnés selon un gradient d'intensité agricole. Les analyses des niveaux de rétinol hépatique, de rétinol plasmatique et d'esters de rétinol hépatiques ont toutes été réalisées en chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les résultats démontrent une baisse du rétinol plasmatique au site de forte intensité agricole de la rivière Noire par rapport aux sites témoins pour les mâles échantillonnés en 2007 ($p = 0,0006$) et en 2008 ($p = 0,01$). Cependant, les concentrations des rétinoïdes hépatiques chez les mâles provenant de ce site ne sont pas différentes du site témoin de Deborah Stairs. Les différences ne sont cependant pas significatives chez les femelles qui présentent de plus grandes concentrations de rétinol plasmatique que les mâles ($p = 0,001$ pour les deux années regroupées). Chez les mâles, la baisse du rétinol plasmatique jumelée à une concentration normale de rétinoïdes hépatiques suggère une altération du transport du rétinol pour les ouaouarons provenant du site de la rivière Noire.

Le transport du rétinol étant assuré par deux protéines, la RBP (protéine de liaison au rétinol) et la TTR (transthyrétine), nous avons tenté de mesurer les niveaux de ces deux protéines dans le sang avec une méthode de HPLC par exclusion de taille. Nous avons également essayé de mesurer les taux de synthèse hépatique de ces

molécules en RT-PCR. Bien que ces deux tentatives se soient avérées non concluantes, cette étude a permis de réaliser d'importants progrès en ce qui concerne la mise au point de ces deux techniques. La RBP et la TTR sont deux molécules importantes pour de nombreuses fonctions physiologiques, c'est pourquoi il apparaît essentiel de poursuivre ces travaux qui pourraient amener des avancées importantes dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique et qui pourraient contribuer à expliquer un débalancement des rétinoïdes et un déclin des amphibiens.

Mots clés: Amphibiens, *Rana catesbeiana*, contaminants agricoles, rétinoïdes, rétinol, esters de rétinol, RBP, TTR, pesticides, écotoxicologie aquatique.

INTRODUCTION

Au cours des 20 dernières années, un déclin des populations d'amphibiens a été documenté à travers le monde (Houlahan *et al.*, 2000). Une diminution de la diversité, des extinctions locales et, à certains endroits, une incidence élevée de malformations ont été observées chez les représentants de cette classe de vertébrés (Wake, 1991). Les causes exactes de ce déclin ne sont pas encore totalement élucidées, mais on sait déjà que la perte de l'habitat et la contamination du milieu représentent des éléments importants de cette problématique (Woodford et Meyer, 2003; Sparling *et al.*, 2001). Les substances utilisées en agriculture, dont les pesticides, pourraient jouer un rôle de premier plan dans la détérioration de la santé des amphibiens. En effet, il a été démontré que certains pesticides, par différents mécanismes, affectent les amphibiens (Boily *et al.*, 2005; Groppelli *et al.*, 2005; Tavera-Mendoza *et al.*, 2002).

On utilise de plus en plus de pesticides afin de protéger les cultures contre les organismes nuisibles dans le but d'améliorer les rendements. Au Canada, entre 1992 et 2002, il y a eu une augmentation de 23,6% de la vente d'ingrédients actifs de pesticides. Au Québec, où la majeure partie de l'agriculture se concentre dans les basses terres du Saint-Laurent, les pesticides vendus en 2001 comprenaient 300 ingrédients faisant partie de la composition de 1100 préparations commerciales et totalisaient plus de 8 millions de kg de préparations commerciales (Tellier, 2006). Le ruissellement de ces substances dans les cours d'eau avoisinants peut provoquer des problèmes de santé chez les organismes aquatiques (Bérubé *et al.*, 2005; Ouellet *et al.*, 1997).

Chez les organismes vivants, la concentration de certaines molécules doit être maintenue dans un intervalle très précis. Les rétinoïdes, qui comprennent la vitamine

A et ses dérivés, font partie de ces molécules. Leur homéostasie doit être finement régulée pour que l'organisme se développe de façon normale et que les besoins en rétinoïdes soient comblés adéquatement tout au long de la vie. Certaines formes de rétinoïdes, biologiquement actives, sont impliquées dans la transcription des gènes et peuvent ainsi provoquer des effets pléiotropiques chez l'organisme (Chambon, 1996). Or, chez certains animaux, dont le pigeon domestique (*Columba livia*), le goéland argenté (*Larus argentatus*), l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*), la grenouille léopard (*Rana pipiens*) et le rat, l'homéostasie des rétinoïdes semble affectée par des contaminants environnementaux (Boily *et al.*, 2004). Cette situation s'avère extrêmement néfaste en causant plusieurs altérations puisque les rétinoïdes sont essentiels à plusieurs fonctions physiologiques comme la croissance, la différenciation cellulaire, la reproduction et l'immunité (Simms et Ross, 2000b; Spear et Bourbonnais, 2000; Ross et Hammerling, 1994; Sporn 1994; Wolf, 1984). Des études ont notamment été réalisées chez des amphibiens (Boily *et al.*, 2004), des oiseaux (Boily *et al.*, 1994), des poissons (Besselink *et al.*, 1998) ainsi que chez des mammifères (Tornero *et al.*, 2006; Skaare *et al.*, 2001). Celles-ci ont toutes démontrées un déséquilibre de l'homéostasie des rétinoïdes chez les organismes exposés à des contaminants.

Comme les rétinoïdes sont des molécules maintenues dans des gammes de concentrations très étroites, les mécanismes de transport de ces composés, du foie vers les cellules cibles, doivent être très efficaces. Ce transport est effectué grâce à deux protéines: la protéine de liaison au rétinol (RBP) et la transthyrétine (TTR) (Soprano et Blaner, 1994). En admettant que des polluants environnementaux affectent ces protéines, on pourrait assister, indirectement, à un déséquilibre de l'homéostasie des rétinoïdes.

L'utilisation des amphibiens comme espèces sentinelles est maintenant reconnue à travers le monde (Barinaga, 1990). Elle se justifie par des caractéristiques

propres à cette classe animale, comme le cycle de vie principalement aquatique et leur peau perméable, qui engendrent une forte exposition des amphibiens aux contaminants aquatiques. Ainsi, certains chercheurs ont tenté d'utiliser les rétinoïdes en tant que biomarqueurs de l'état de santé des ouaouarons, et donc, de l'état du milieu. Les études effectuées ont démontré que les ouaouarons provenant de régions fortement agricoles présentent une diminution du rétinol plasmatique, une augmentation du rétinol hépatique, ainsi qu'un appauvrissement des réserves d'esters de rétinol emmagasinés dans le foie (Boily *et al.*, 2009; Bérubé *et al.*, 2005). On peut dès lors supposer que le transport de ces molécules dans la circulation sanguine est affecté par les contaminants retrouvés dans l'eau.

Ce projet de recherche s'inscrit dans le cadre du « Projet Amphibiens », une vaste étude faisant intervenir des chercheurs de différentes institutions qui tentent de déterminer si la contamination d'origine agricole influence la santé des amphibiens vivant à proximité des grandes cultures dans le bassin versant de la rivière Yamaska. Le choix de la rivière Yamaska s'explique par le fait qu'il s'agit de l'un des cours d'eau les plus contaminés du Québec et qu'il est possible d'y établir un gradient représentant différentes intensités d'agriculture. En effet, on retrouve à proximité de celui-ci la majorité des grandes cultures (maïs, soya) de la province ainsi que plusieurs élevages industriels (porc et poulet).

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Déclin des populations d'amphibiens à travers le monde.

De nos jours, la perte de la biodiversité est une préoccupation internationale. Même si on ne connaît pas exactement le nombre d'espèces qui s'éteignent, il a été estimé que le taux d'extinction actuel est le plus important des 100 000 dernières années (Eldridge, 1998). Depuis les années 80, les herpétologistes documentent de plus en plus de déclin et d'extinction d'espèces. En 1989, au premier congrès mondial d'herpétologie, des scientifiques de partout à travers le monde en sont venus à la conclusion qu'il y avait possiblement un déclin global des amphibiens (Collins et Storfer, 2003). Il ne fait d'ailleurs maintenant plus aucun doute que les populations d'amphibiens sont en déclin, et ce, à travers le monde. Cette classe de vertébrés subit d'ailleurs un déclin plus accentué que les mammifères et les oiseaux (Stuart *et al.*, 2004). Cette situation est alarmante puisque les amphibiens sont des organismes essentiels au bon fonctionnement de nombreux écosystèmes dont ils constituent souvent la plus forte proportion de la biomasse des vertébrés (Gardner, 2001). De plus, ils représentent à la fois des prédateurs et des proies et ils jouent ainsi un rôle capital dans le dynamisme trophique. Leur déclin pourrait avoir des répercussions importantes sur les autres organismes de l'écosystème. Finalement, d'un point de vue anthropocentrique, les amphibiens peuvent être utilisés en tant que bioindicateurs de l'état de l'environnement et ils constituent aussi une réserve importante de produits pharmaceutiques (Blaustein *et al.*, 1994).

Les causes de ce déclin ont fait l'objet de nombreuses études et discussions. Elles varient selon l'espèce, le type d'habitat et des effets synergiques complexes entre une multitude de facteurs environnementaux (Gardner, 2001). Le problème

semble donc engendré par un ensemble de facteurs agissant de concert dont l'altération de l'habitat, l'augmentation du rayonnement ultraviolet, l'introduction d'espèces exotiques, les maladies, les changements climatiques et la contamination environnementale (Beebee et Griffiths, 2005; Blaustein et Kiesecker, 2002). La perte d'habitat semble jouer un rôle important dans le déclin des amphibiens (Delis *et al.*, 1996). En effet, l'utilisation de l'espace par les humains peut provoquer la mort directe de certains organismes (Fahrig *et al.*, 1995), détruire des habitats en plus d'altérer des sites importants pour la reproduction (Woodford et Meyer, 2003). L'introduction d'espèces exotiques peut également avoir un effet nocif pour les populations d'amphibiens: prédation, compétition à différents stades de développement et introduction de pathogènes (Collins et Storfer, 2003; Knapp et Matthews, 2000). Les maladies infectieuses émergentes sont d'ailleurs une des causes qui sont mises de l'avant. Les deux principaux pathogènes qui sont pointées du doigt sont un champignon chytride et les iridovirus (Collins et Storfer, 2003). En outre, les changements climatiques représentent aussi une cause possible du phénomène en modifiant, entre autres, les quantités et le moment des précipitations (McCarty, 2001), ce qui peut affecter la survie des œufs (Crump *et al.*, 1992). Les changements climatiques peuvent aussi causer une augmentation du rayonnement ultraviolet (Blaustein *et al.*, 1998) et favoriser le développement de maladies infectieuses (Kiesecker et Blaustein, 1995). L'augmentation des rayons UV peut, quant à elle, provoquer l'assèchement de petits étangs et ainsi diminuer la disponibilité de sites de reproduction. Il s'agit ici d'un cercle vicieux puisque l'assèchement des marais permet à son tour l'infiltration de plus de rayons UV. Finalement, la contamination du milieu peut être impliquée dans le déclin de certaines espèces d'amphibiens. Plus précisément, la contamination d'origine agricole semble impliquée dans la disparition de certaines espèces (Sparling, 2001; Stallard, 2001; Lips, 1998). Cette avenue est celle qui a été analysée dans l'étude présente et les détails des différents mécanismes d'action impliqués sont présentés dans les sections qui suivent.

1.2. Développement de l'agriculture

1.2.1 Évolution de l'agriculture

Au cours des dernières décennies, le mode d'agriculture a grandement changé sur l'ensemble de la planète. L'agriculture intensive est en effet de plus en plus répandue à l'échelle mondiale. Elle consiste à maximiser les rendements afin de produire des récoltes optimales en fonction de la main-d'œuvre et des sols disponibles. Elle est caractérisée par l'utilisation importante de fertilisants et de pesticides. Il va de soi qu'avec l'avènement d'un tel type de culture, sont apparus des impacts environnementaux importants. Plusieurs chercheurs se sont penchés sur l'impact que peuvent avoir les pesticides d'abord sur la santé humaine, puis, plus tard, sur la santé de l'ensemble des organismes vivants et des écosystèmes. Les études tiennent compte des effets des pesticides, mais aussi de leur comportement (transport, demi-vie, etc.) dans les différents compartiments de l'environnement (Van der Werf, 1996).

1.2.2 Contaminants retrouvés en milieu agricole

On retrouve plusieurs types de polluants dans les milieux agricoles. Les nitrites et les nitrates sont des contaminants importants en raison de l'utilisation d'engrais chimiques et naturels. Certains pesticides utilisés en agriculture, tel que les organochlorés, ainsi que leurs métabolites, persistent longtemps dans l'environnement et affectent les amphibiens (Lips, 1998). Malgré le fait que certaines de ces substances aient été bannies en Amérique du Nord et en Europe, leur utilisation est toujours permise et largement répandue dans les pays en développement (Colborn, 1993). Dans le Sud du Québec, les pesticides contaminent les eaux de surface ainsi que les eaux souterraines dans les régions agricoles (Berryman et Giroux, 1994). À proximité des cultures de maïs et de pommes de terre, les concentrations de pesticides dans l'eau excèdent d'ailleurs souvent les valeurs recommandées pour la protection de la vie aquatique (Ouellet, 1997). Le MDDEP

dénote que de 11 à 28 % des échantillons prélevés au site de la rivière Chibouet (un affluent de la rivière Yamaska) entre 1999 et 2001 dépassaient les critères de qualité de l'eau établis pour la protection des espèces aquatiques. Parmi les pesticides excédant ces critères, les plus importants semblent être les herbicides atrazine et métolachlore avec des pointes de 30 µg/l et 41 µg/l respectivement. Des dépassements de critères ont aussi été notés pour les insecticides chlorpyrifos et malathion (Giroux, 2004). Il importe de mentionner que la majorité des pesticides détectés sont ceux utilisés dans les cultures de maïs et de soya. De plus, l'épandage de pesticides a souvent lieu au printemps et les concentrations les plus élevées de pesticides sont détectées pendant les périodes de reproduction des grenouilles et de développement initial des têtards (Coady *et al.*, 2005; Hayes *et al.*, 2002; Whitgott, 2002). Malgré tout, la période de croissance rapide du maïs et d'application de pesticides se déroule majoritairement du début juin au début du mois d'août dans le bassin de la Yamaska (Spear *et al.*, 2009). L'application intensive d'herbicides a habituellement lieu à la fin juin ou au début du mois de juillet (Boily, 2005).

1.2.3 Effets des contaminants agricoles sur les organismes

Il est de plus en plus reconnu qu'une multitude d'organismes de différentes espèces vivants dans des régions agricoles sont affectés par les polluants. Par exemple, on sait que les oiseaux adultes sont affectés de façon directe par les pesticides, mais aussi que ceux-ci provoquent indirectement des effets néfastes chez les embryons en augmentant la mortalité, en provoquant des malformations et en diminuant les chances d'éclosion (Fry, 1995). Galloway et Handy (2003) rapportent que les pesticides organophosphorés comme le parathion, le chlorpyrifos, le malathion et le diazinon affectent le système immunitaire de différents invertébrés, poissons et vertébrés supérieurs en inhibant des composants de la réponse immune ou par un stress oxydatif aux organes du système immunitaire. Grasman *et al.* (1996) a pour sa part démontré, dans une étude de terrain, que des sternes caspiennes (*Sterna*

caspia) exposés à des organochlorés, dans la région des Grands Lacs, subissaient une immunosuppression. Pour leur part, Sheffield et Lochmiller (2001) ont démontré que des petits mammifères étaient affectés par le diazinon dans une étude de terrain réalisée en mésocosme. Certaines relations entre espèces étaient affectées et la capacité de reproduction de certaines espèces était aussi diminuée. Des études sur des goélands argentés (*Larus argentatus*) des Grands Lacs et des esturgeons jaunes (*Acipenser fulvescens*) du Saint-Laurent suggèrent que les niveaux d'esters de rétinol hépatiques diminuent dans les régions contaminées (Rolland, 2000; Doyon et al., 1998; Spear et Moon, 1986). Les pesticides pourraient également avoir un impact négatif sur la santé humaine. En effet, 15 des 17 études évaluées à partir de la littérature par Bolognesi (2003) démontrent des risques d'effets génotoxiques chez les applicateurs de pesticides.

En ce qui concerne les amphibiens, des études de terrain démontrent qu'il y a une forte incidence de malformations des membres postérieurs chez des individus provenant de sites où l'on a découvert des pesticides utilisés en agriculture. Ces malformations sont beaucoup fréquentes chez les anoures en métamorphose que chez les animaux matures. Cette observation s'explique par le fait que les malformations constituent un désavantage pour la survie puisqu'elles affectent la capacité de nager et de sauter. Ainsi, les grenouilles malformées sont plus susceptibles de mourir avant l'âge adulte (Ouellet *et al.*, 1997). Taylor *et al.* (2005) ont aussi démontré que les grenouilles vivant à proximité de régions agricoles présentent deux fois plus de risques de développer des malformations. Des études de laboratoire démontrent aussi qu'une exposition aux fongicides triadimefon ou triadimenol induit des déformations au niveau du crâne (Groppelli, 2005). Une diminution de la croissance a également été détectée chez les anuriens exposés à l'atrazine et au carbaryl (Hayes, 2006; Boones et James, 2003) et à des mélanges de pesticides (Hayes, 2006) dans des études de laboratoire. Ces effets ne sont pas que le lot des populations d'amphibiens vivant à proximité de zones agricoles. En effet, on a découvert des accumulations

significatives de pesticides, tel que du chlordane, du nonachlore et du DDE, dans les tissus de grenouilles et dans l'eau provenant de sites non agricoles, mais qui reçoivent des contaminants aéroportés en provenance des régions agricoles (Fellers *et al.*, 2004). Des études démontrent également que les têtards exposés aux pesticides sont affectés plus tard lors de leur développement. C'est notamment le cas pour les têtards de grenouilles léopards exposées au carbaryl dans une étude de laboratoire réalisée par Bridges (2000).

Toutefois, un problème se pose puisque la plupart des études de laboratoire ont été effectuées à des doses relativement élevées qui ne sont pas représentatives des concentrations environnementales (Hayes *et al.*, 2006). De plus, ces études examinent souvent l'impact d'un seul pesticide. Or, dans les milieux naturels, il y a présence d'une «soupe» de pesticides qui peuvent agir en synergie, de façon additive ou de manière antagoniste. Il est donc primordial d'effectuer des études en milieu naturel qui permettent de mieux connaître l'effet d'un mélange de pesticides à des concentrations que l'on retrouve dans l'environnement. Des études effectuées en laboratoire sur des rats et des souris permettent de constater que certains effets surviennent lors d'une exposition à un mélange de pesticides alors que ces effets ne sont pas visibles lors d'une exposition à ces mêmes pesticides de façon individuelle (Jaeger *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 1993; Boyd *et al.*, 1990). Une étude de laboratoire de Relyea (2004) démontre pour sa part un effet additif des pesticides sur la croissance et la survie. Dans cette étude, quatre formulations commerciales de pesticides (diazinon, carbaryl, malathion et glyphosate) ont été testées de façon individuelle (1 et 2 mg/l d'ingrédient actif) et en combinaison (1 mg/l de chaque pesticide) sur cinq espèces d'amphibiens (*Rana pipiens*, *Rana clamitans*, *Rana catesbeiana*, *Bufo americanus* et *Hyla versicolor*).

Non seulement il peut y avoir interaction entre des pesticides, mais plusieurs études montrent qu'il y a interaction entre pesticides et fertilisants (Greenlee *et al.*,

2004 ; Jaeger *et al.*, 1999). Ainsi, chez des têtards de l'espèce *Rana pipiens* certains effets toxiques sont plus marqués lors d'une exposition à un mélange d'atrazine et de nitrates que lors d'une exposition individuelle à ces contaminants (Orton *et al.*, 2006). Dans une autre étude réalisée dans des mésocosmes avec des têtards de l'espèce *Xenopus laevis*, une exposition à des nitrates seulement n'affectait pas les individus. Par contre, lorsque les têtards étaient exposés à un mélange d'atrazine et de nitrates des effets synergiques sur le poids et la longueur museau-cloaque (LMC) à la métamorphose ont été rapportés (Brown Sullivan et Spence, 2003). La présence de nitrate peut aussi créer une augmentation du pH et, par le fait même, une augmentation de la mobilité de l'atrazine dans le sol, et, conséquemment, dans les cours d'eau (Liu *et al.*, 1995).

1.3. Les rétinoïdes

1.3.1 Description et rôles des rétinoïdes

Les rétinoïdes peuvent être décrits comme des composés structurellement similaires au rétinol (vitamine A) dont certains peuvent produire des réponses biologiques spécifiques en se liant à un récepteur ou un groupe de récepteurs (Barua et Furr, 1998) pouvant ainsi modifier l'expression de gènes divers (Zile, 1998; Chambon, 1996). À l'échelle moléculaire, ils sont constitués de trois domaines distincts: un anneau β -ionone, une chaîne latérale constituée de quatre unités isoprènes liées entre elles et un groupe polaire terminal (fig. 1.1). L'état d'oxydation du groupe terminal indique la spécificité du rétinoïde. Par exemple, le rétinol possède un groupe terminal hydroxyle, le rétinaldéhyde un groupe terminal aldéhyde alors que l'acide rétinoïque présente un groupe terminal carboxyle (Noy, 2000). Le métabolisme des rétinoïdes est surtout connu chez les mammifères. Par conséquent, les modèles décrits dans cette section se rapportent à ce groupe.

Les rétinoïdes sont des molécules très instables qui sont aisément isomérisées et dégradées lorsqu'elles sont exposées à des oxydants comme l'oxygène de l'air, la lumière ou la chaleur excessive. Par contre, ils sont relativement stables lorsqu'ils sont dans le plasma ou dans les tissus puisqu'ils sont alors liés à des protéines ou protégés par des antioxydants. Tous les rétinoïdes sont des molécules lipophiles, mais leur solubilité dans les solvants organiques dépend de leur groupement terminal (Barua et Furr, 1998).

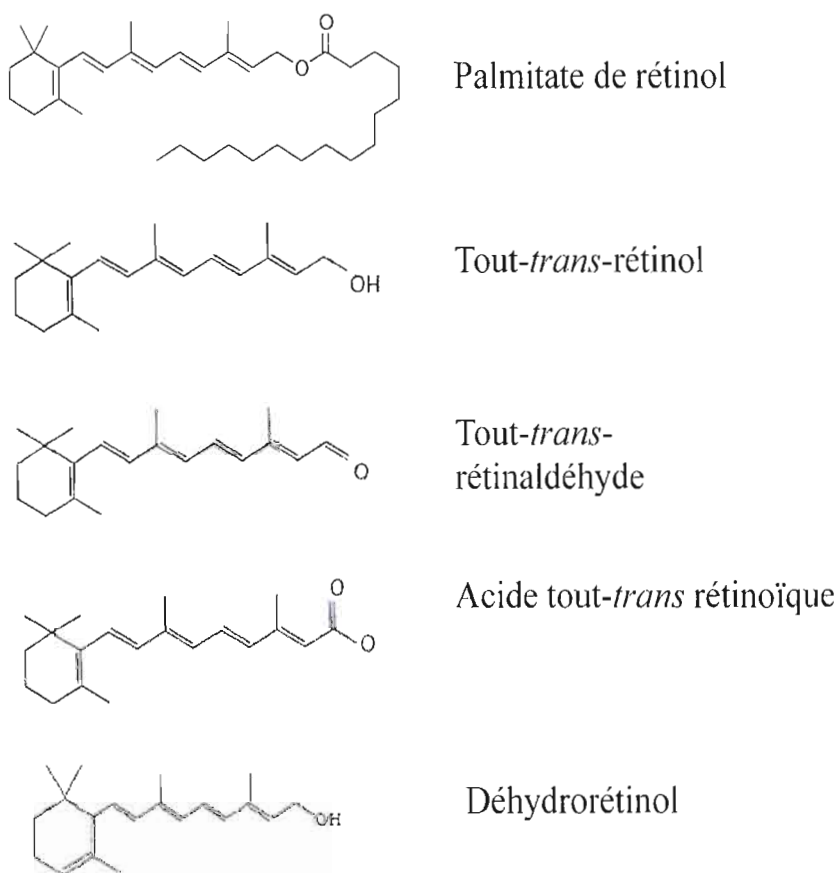


Figure 1.1 : Structure moléculaire de différents rétinoïdes

Les rétinoïdes sont des molécules extrêmement importantes pour les vertébrés (fig. 1.2) et sont impliqués dans plusieurs processus essentiels comme la croissance, le développement et la différenciation cellulaire (Simms et Ross, 2000b; Barua et Furr, 1998; Mangelsdorf, 1994). En effet, les rétinoïdes ont une fonction critique dans des moments clés du développement des vertébrés. Ils vont donc façonner le patron de formation des différents organes. Les concentrations d'acide rétinoïque, une des formes actives des rétinoïdes, vont influencer la migration des cellules selon un certain axe de polarité (Hofmann et Eichele, 1994). Les rétinoïdes agissent aussi sur le système immunitaire, dans la résistance aux infections, en contrôlant la survie des lymphocytes (Ross et Hammerling, 1994) et sont impliqués dans le bon fonctionnement des systèmes reproducteur et endocrinien (Simms et Ross, 2000b; Wolf, 1984). Ils agissent également de manière non génomique avec des protéines importantes pour la vision (Zile, 1998). Ainsi, on sait depuis quelques années que le 11-*cis*-rétinaldéhyde s'associe avec la rhodopsine pour former un chromophore (Kochendoerfer et al., 1999 ; Saari, 1994; Wald, 1968).

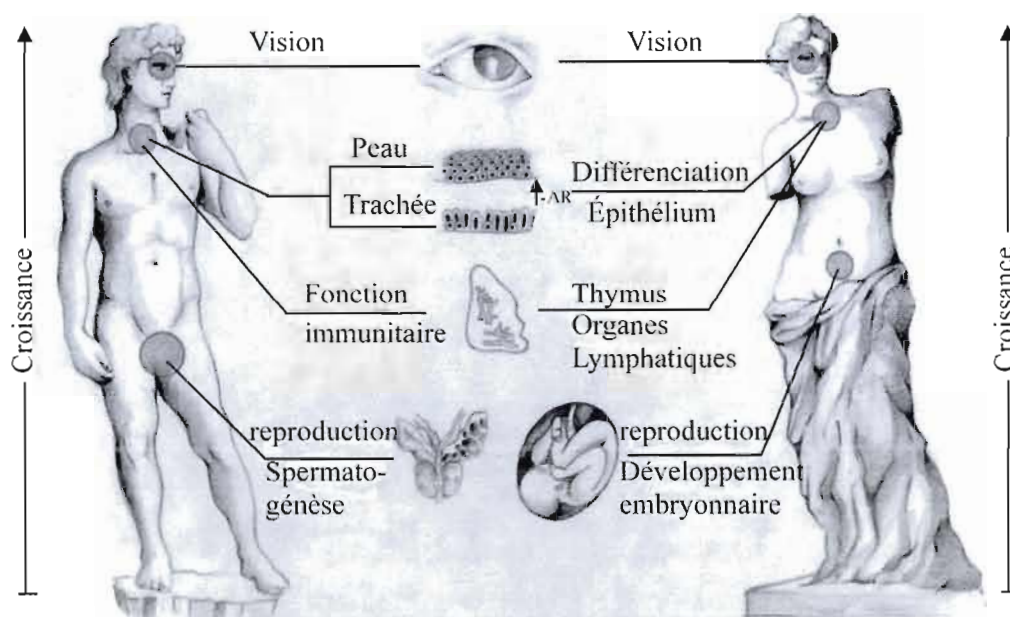


Figure 1.2 : Résumé du rôle des rétinoïdes (Adaptée de Ross *et al.*, 2000).

Bien que les rétinoïdes soient essentiels, leurs concentrations doivent être finement modulées puisqu'un excès ou un manque peut avoir des conséquences graves pour un organisme et pour le développement de l'embryon. En effet, presque tous les organes et les tissus peuvent être affectés par l'acide rétinoïque si l'embryon est exposé à une période critique de son développement (Kastner *et al.*, 1994). En excès, ils possèdent un potentiel tératogène élevé et causent des irritations cutanées (Lemaire *et al.*, 2005; Barua et Furr, 1998; Zile 1998). De plus, il peut y avoir dépôt excessif lors de l'ossification engendrant la formation d'os très denses. À l'opposé, une carence en vitamine A à différents stades du développement provoque des malformations du cœur, des tissus oculaires et des membranes, ainsi que dans les systèmes nerveux, cardiovasculaire, respiratoire et uro-génital (Zile, 2001, 1998). En plus de ces malformations, il peut y avoir des symptômes caractérisés par la fragilité des os, des lésions cutanées, une perte de poids et l'inhibition de la croissance (Boily *et al.*, 2004).

Plus précisément, une des formes actives des rétinoïdes, l'acide rétinoïque, se lie à des récepteurs nucléaires dans le noyau des cellules afin d'activer des gènes cibles. Plusieurs expériences ont été réalisées avec des souris ne possédant pas certaines des enzymes nécessaires à la production d'acide rétinoïque. Ainsi, les souris qui ne possédaient pas l'enzyme RALDH-2 (rétinal déshydrogénase-2) présentent une multitude de malformations (Niederreither *et al.*, 1999). Un résultat intéressant ressort de cette étude. En effet, une déficience de cette enzyme semble provoquer à elle seule l'ensemble des malformations que l'on observe chez un embryon privé de rétinoïdes. Cela suggère que cette seule enzyme est responsable de la majeure partie de la production d'acide rétinoïque chez l'embryon (Maden, 2000).

D'autres expériences impliquent les récepteurs RAR et RXR (récepteurs nucléaires des rétinoïdes) qui existent dans les isoformes α , β et γ . En l'absence d'une

seule de ces isoformes, des altérations du développement ne sont presque pas observées alors qu'en l'absence d'au moins deux de ces récepteurs, des altérations sévères du développement apparaissent (Kastner *et al.*, 1995). En ce qui concerne le récepteur RXR, l'absence de l'isoforme RXR α provoquerait certaines malformations (Sucov *et al.*, 1994) alors que l'absence de l'isoforme RXR β ne provoquerait aucun effet sur le développement, mais les adultes seraient stériles (Kastner *et al.*, 1996). *In vivo*, l'acide rétinoïque doit se lier à un récepteur hétérodimérique constitué d'une unité RXR et d'une unité RAR (Maden, 2000).

En laboratoire, lorsque l'on prive des embryons de caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*) de rétinol au tout début du développement, les embryons présentent pratiquement toutes les malformations que l'on observe chez les embryons ne possédant pas l'enzyme RALDH-2 (Maden, 2000). Les embryons de rats privés de rétinoïdes à des étapes plus tardives du développement présentent aussi plusieurs malformations aux yeux, au cœur, du système nerveux et des canaux urogénitaux (Dickman, 1997).

1.3.2. Métabolisme des rétinoïdes: de l'absorption au foie

Chez les vertébrés, le rétinol ne peut être synthétisé *de novo* (Blomhoff *et al.*, 1990). Ainsi, tous les rétinoïdes présents dans l'organisme proviennent de l'alimentation (fig. 1.3). Celle-ci fournit en effet les précurseurs des rétinoïdes sous forme de caroténoïdes (le β -carotène est le précurseur le plus efficace) ou d'esters de rétinol (Olson, 1986). Alors que des caroténoïdes se retrouvent dans les fruits et les légumes (carottes, épinards, patates douces, etc.), les esters de rétinol sont présents dans certains produits animaux (viande, foie, œufs, etc.). Les caroténoïdes subissent un clivage oxydatif pour être transformés en rétinal dans le lumen de l'intestin et dans les cellules de la muqueuse intestinale. Ce clivage oxydatif est suivi d'une réduction qui permet la conversion du rétinal en rétinol (Sporn *et al.*, 1994; Olson, 1986). Le

rétinol du lumen est alors transféré aux cellules de la muqueuse. À cet endroit, il se lie à la CRBP-II (protéine de liaison intracellulaire du rétinol II) avant d'être estérifié principalement par la LRAT (lecithin: rétinol acyltransférase). L'enzyme ARAT (Acyl-CoA: rétinol acyltransférase) est aussi impliquée dans ce processus lorsqu'il y a de grandes quantités de rétinol; on lui reconnaît en effet une préférence pour le rétinol non lié. Les esters de rétinol sont emmagasinés dans des chylomicrons naissants. Ceux-ci sont sécrétés dans le système lymphatique où une lipoprotéine lipase les transforme en chylomicrons rémanents qui transfèrent les esters de rétinol aux cellules parenchymateuses du foie pour être finalement entreposés dans les cellules étoilées (Sporn *et al.*, 1994). Bien que le métabolisme présenté dans cette section soit celui que l'on retrouve chez les mammifères, on pense que le métabolisme est très semblable chez les amphibiens. Les différences seront soulevées un peu plus loin dans le texte.

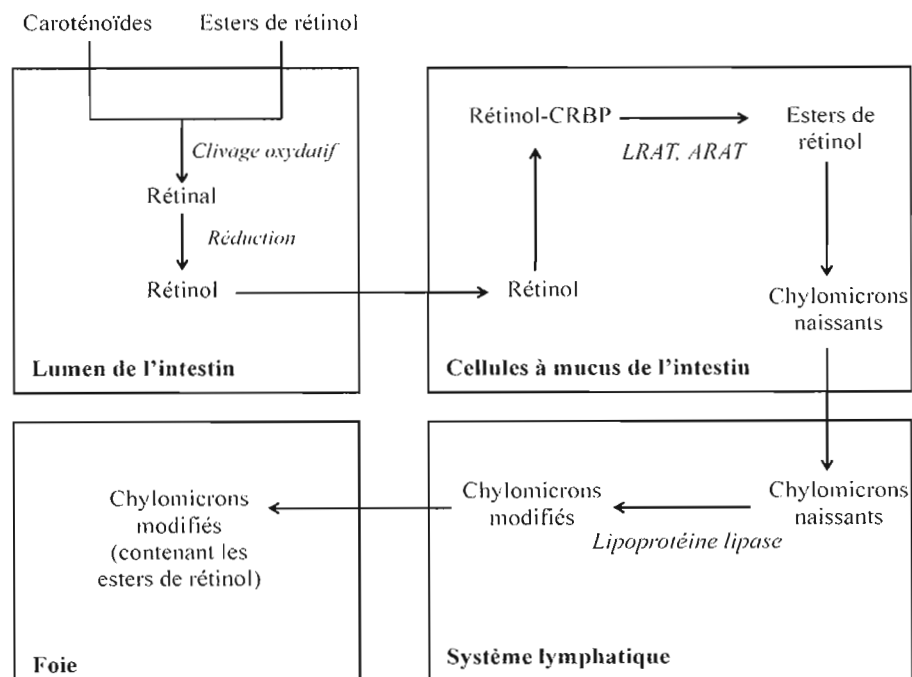


Fig. 1.3 : Apport alimentaire et transport des rétinoïdes au foie

C'est dans le foie qu'il y a régulation des concentrations de rétinol qui entrent dans la circulation sanguine (fig. 1.4). La régulation est assurée par deux des quatre types de cellules du foie, c'est-à-dire par les cellules parenchymateuses (aussi appelées hépatocytes) et les cellules étoilées.

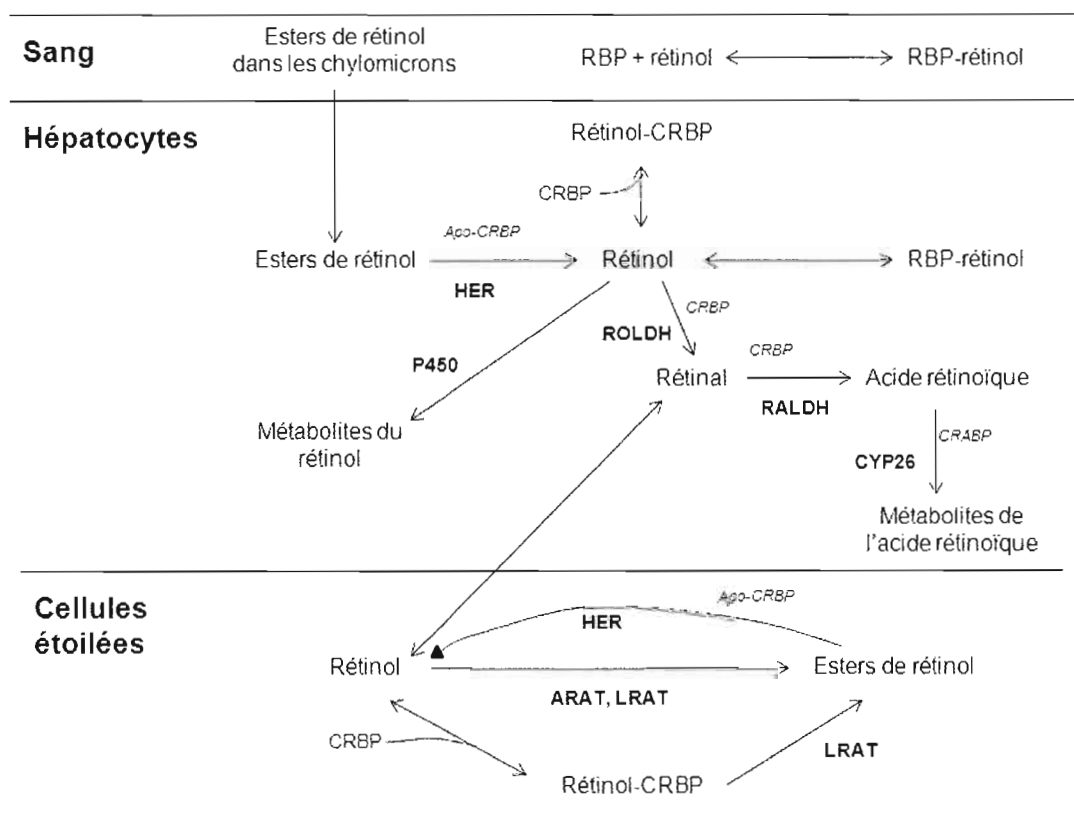


Fig. 1.4 : Métabolisme hépatique des rétinoïdes (Adaptée de Noy, 2000). Les termes en caractères gras représentent les enzymes impliquées alors que les termes en italique indiquent les molécules qui régulent de manière positive les processus métaboliques.

Les chylomicrons sont d'abord captés par les cellules parenchymateuses. Ce processus requiert la participation d'un récepteur à la surface cellulaire qui reconnaît les composantes apolipoprotéines, apoB et apoE du chylomicron (Sporn *et al.*, 1994). Les esters de rétinol subissent ensuite une hydrolyse rapide par une HER (hydrolase des esters de rétinol), ce qui engendre la formation de rétinol libre. Lorsqu'il y a

présence de vitamine A en excès dans l'organisme, le rétinol est envoyé vers les cellules étoilées où il est de nouveau estérifié en esters de rétinol par ARAT et LRAT. Les rétinoïdes sont alors stockés sous cette forme dans les cellules étoilées. Lors de déficiences subséquentes en vitamine A, ces esters sont hydrolysés par la HER pour former du rétinol qui passe alors aux cellules parenchymateuses où il peut être dirigé vers trois voies différentes. Le rétinol des cellules parenchymateuses peut former un complexe avec la RBP (liaison dans un rapport 1: 1) pour être sécrété dans le plasma et dirigé aux cellules cibles. La deuxième voie implique une dégradation du rétinol par des enzymes du cytochrome P450. Le rétinol peut finalement être transformé en rétinal par des RoldH (rétinol déshydrogénase). Le rétinal ainsi formé est transformé en acide rétinoïque par des RalDH (rétinal déshydrogénase). L'acide rétinoïque exerce alors ses effets sur la transcription de certains gènes ou est dégradé par les enzymes CYP26 du cytochrome P450 (Noy, 2000). L'acide rétinoïque peut également être conjugué à l'acide glucuronique avant d'être éliminé (Napoli, 1999).

Les protéines intracellulaires de liaison au rétinol (CRPB) assurent la régulation du métabolisme des rétinoïdes à plusieurs des étapes mentionnées (Napoli, 1996). Tout d'abord, les CRBP, en se liant au rétinol libre dans les cellules parenchymateuses, provoquent une modification de l'équilibre entre les pools cellulaire et plasmatique de rétinol. Ainsi, la liaison du rétinol aux CRBP provoque l'entrée de rétinol dans les cellules parenchymateuses. Ces protéines contrôlent aussi la formation et l'hydrolyse des esters de rétinol. Le rétinol lié aux CRBP dans les cellules étoilées est estérifié exclusivement par l'enzyme LRAT alors que les CRBP libres inhibent LRAT et facilitent l'activité HER dans les deux types de cellules. Les CRBP libres pourraient stimuler l'action des HER de deux façons. Tout d'abord, elles agiraient directement sur l'enzyme pour stimuler son activité. Cependant, en tant qu'accepteurs spécifiques du rétinol, elles accélèrent aussi la formation du produit de la réaction enzymatique catalysée par les HER et favorisent ainsi l'hydrolyse du rétinol (Napoli, 1999). Finalement, les CRBP dans les cellules parenchymateuses

favorisent, pour leur part, les enzymes RoldH et RalDH au détriment des autres enzymes (Noy, 2000).

1.3.3 Impact des polluants agricoles sur le métabolisme des rétinoïdes chez les amphibiens

La majorité des études mentionnées dans la section 1.2.3 focalisent sur les effets visibles des pesticides tels que la mortalité ou les malformations. Par contre, les populations exposées peuvent subir un déclin sans que des effets aussi évidents ne soient observés (Hayes *et al.*, 2002). Par surcroît, les impacts physiologiques des pesticides sur les amphibiens ne sont pas précisément élucidés pour tous les pesticides (Boily *et al.*, 2005). Il est donc important de porter une attention particulière aux effets métaboliques des pesticides afin de déterminer de quelle façon ils affectent les individus. Plusieurs mécanismes physiologiques peuvent expliquer l'effet des pesticides sur les amphibiens. Il a été suggéré que ceux-ci puissent agir comme des perturbateurs endocriniens (Colborn *et al.*, 1993). Par exemple, Hayes *et al.* (2002) ont déterminé que l'atrazine induit l'aromatase et favorise la conversion de testostérone en œstrogène causant par le fait même une altération des fonctions sexuelles et une féminisation de la population à des concentrations de 0,1 ppb (parties par milliard). En outre, il a été démontré qu'une exposition des têtards de *Xenopus laevis* à de l'atrazine à une concentration de 21 µg/L cause des altérations au niveau des testicules (Tavera-Mendoza *et al.*, 2002). Par ailleurs, un des mécanismes d'action le plus souvent suggéré fait intervenir un affaiblissement du système immunitaire. La diminution de l'efficacité du système immunitaire pourrait alors augmenter la susceptibilité aux parasites, engendrant une mortalité plus élevée (Hayes *et al.*, 2006; Christin *et al.*, 2003) et pouvant causer des malformations (Kiesecker, 2002). De plus, Gendron *et al.* (2003) ont aussi démontré que le système immunitaire est affaibli (augmentation des infections par les vers) suite à une exposition à un mélange de pesticides, ce qui a pour effet final d'augmenter la virulence d'un parasite

(*Rhabdias ranae*) chez la grenouille léopard (*Rana pipiens*). Finalement, il est possible que les contaminants agricoles perturbent le métabolisme des rétinoïdes. Dans les dernières années, plusieurs études ont démontré qu'il pourrait y avoir un lien entre les contaminants agricoles et un déséquilibre du métabolisme des rétinoïdes. Il a d'abord été établi, en laboratoire, qu'il y a une altération des niveaux de vitamine A hépatique et plasmatique, chez les têtards, lors d'une exposition au DDT et au sevin (Keshavan et Deshmukh, 1984). Ce phénomène a aussi été observé chez des grenouilles d'âge adulte (Bérubé *et al.*, 2005; Boily *et al.*, 2005; Groppelli *et al.*, 2005) ainsi que chez les rats (Menegola *et al.*, 2004). Chez des ouaouarons provenant de régions fortement agricoles, une augmentation du rétinol hépatique, une diminution des esters de rétinol hépatiques ainsi qu'une diminution du rétinol plasmatique ont été remarquées (Boily *et al.*, 2009; Bérubé *et al.*, 2005). Or, une altération des niveaux de rétinoïdes provoque des effets négatifs sur de nombreux processus dont la réponse immunitaire, la reproduction, la croissance et le développement embryonnaire (Boily *et al.*, 2005). Malgré tout, les impacts des pesticides d'origine agricole sur le métabolisme des rétinoïdes chez les amphibiens sont encore très peu étudiés. Il s'agit d'une voie prometteuse pour expliquer le déclin des populations d'amphibiens puisque les rétinoïdes sont impliqués dans la plupart des processus pouvant mener aux effets observés chez les amphibiens provenant de régions agricoles tels qu'un affaiblissement du système immunitaire, une altération des fonctions sexuelles, une diminution de la croissance et des malformations (Leiva-Presa et Jenssen, 2006; Scotum, 2000; Semba, 1994).

1.3.4 Transport du rétinol vers les cellules cibles

Lorsque le rétinol, lié à la RBP, est sécrété dans le plasma à partir des cellules parenchymateuses, le rétinol demeure lié à la protéine qui le transporte jusqu'aux tissus cibles. En effet, le seul mécanisme de transport du rétinol à partir du foie vers

les tissus par le biais de la circulation sanguine fait intervenir la RBP (Soprano et Blaner, 1994; Blaner, 1989).

La RBP humaine est constituée d'une séquence de 182 acides aminés et il a été établi que la RBP de *Xenopus laevis* présente 68 % d'homologie avec la séquence d'acides aminés de la RBP humaine (Soprano et Blaner, 1994; Zapponi *et al.*, 1992). Les différences se trouvent surtout sur des sites qui n'influencent pas beaucoup la structure tridimensionnelle de la protéine qui peut ainsi exercer la même fonction chez plusieurs espèces. En effet, les régions de la RBP qui participent à des interactions moléculaires ont été particulièrement conservées au cours de l'évolution (Zapponi *et al.*, 1992). La RBP est constituée de 8 brins antiparallèles formant un feuillet β replié sur lui-même de façon à produire un baril β . Ce baril β constitue le cœur de la protéine. C'est d'ailleurs à l'intérieur de celui-ci que la molécule de rétinol est séquestrée. L'anneau β -ionone du rétinol est enfoui profondément dans ce baril alors que le groupe terminal polaire se retrouve pratiquement à la surface de la protéine (Noy, 2000; Chen *et al.*, 1986). La molécule de RBP est surtout synthétisée dans le foie bien que certains autres tissus puissent aussi la produire, notamment les reins et les adipocytes (Noy, 2000). Dans les reins, la RBP synthétisée jouerait surtout un rôle dans le recyclage du rétinol et dans sa réabsorption par les reins alors qu'au niveau des adipocytes la RBP permettrait la mobilisation du rétinol à partir de ce tissu (Soprano et Blaner, 1994).

En plus de posséder un site de liaison pour le rétinol, la molécule de RBP dispose également d'un site de liaison pour la TTR (transthyrétine) qui est situé juste à côté du site de liaison au rétinol (Soprano et Blaner, 1994). Ainsi, une fois le complexe RBP-rétinol sécrété dans le sang, la RBP se lie à la TTR pour former un nouveau complexe, rétinol-RBP-TTR. La présence d'une molécule de rétinol liée à la RBP est essentielle pour la formation d'un complexe stable avec la TTR. Cette

association confère l'avantage physiologique de diminuer la filtration glomérulaire (fig. 1.5) et, par le fait même, l'élimination du complexe rétinol-RBP dont la masse moléculaire est beaucoup plus faible (Monaco, 2000). En effet, la masse moléculaire du complexe rétinol-RBP-TTR est de 80 kDa comparativement à 21 kDa pour le complexe rétinol-RBP (Green et Green, 1994). De plus, la liaison avec la molécule de TTR augmente l'affinité de RBP pour le rétinol améliorant ainsi la stabilité du complexe entre le rétinol et la RBP (Ingenbleek et Young, 1994). La TTR possède quatre sous-unités identiques. Elle possède donc le potentiel de lier quatre molécules de RBP. Cependant, il semble que lorsqu'une molécule de RBP se lie à l'une des sous-unités, l'affinité des autres sous-unités pour la RBP diminue (Chen, 1986; Soprano *et al.*, 1982). C'est la raison pour laquelle la TTR et le complexe RBP-rétinol circulent habituellement dans le sang dans un rapport stœchiométrique 1: 1 (Newcomer et Ong, 2000).

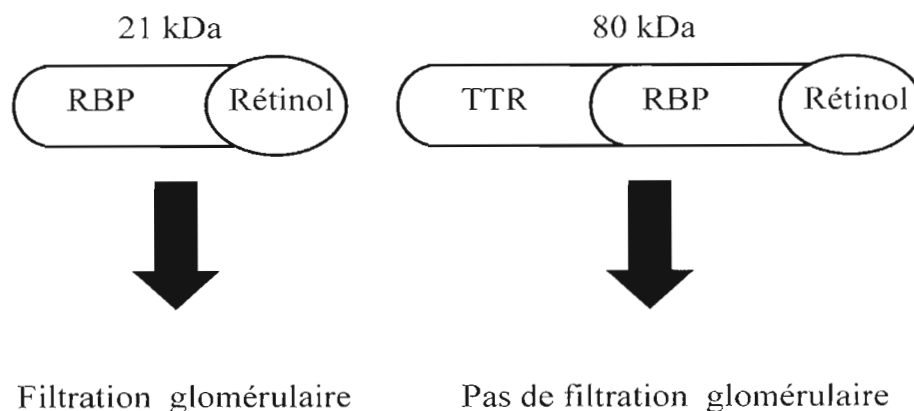


Figure 1.5 : Filtration glomérulaire du complexe RBP-rétinol de 21 kDa et rétention du complexe TTR-RBP-rétinol de 80 kDa.

Chez les amphibiens, la TTR possède une plus grande affinité pour la T_3 (triiodo-L-thyronine) que pour la T_4 (thyroxine) (Prapunpoj *et al.*, 2000). Ainsi, la TTR semble être la principale protéine de transport de la T_3 pour cette classe de vertébrés (Power *et al.*, 2000). Des études démontrent par contre que la TTR ne

semble pas interagir avec la RBP chez les têtards d'amphibiens (Robbins, 1996). Des études ont démontré une différence génétique entre les têtards d'amphibiens et les adultes de la même espèce (Munro, 1986; Shidoji et Muto, 1977). Toutefois, certaines études suggèrent que la RBP plasmatique, chez les amphibiens et les reptiles, se lie à une molécule qui pourrait être la TTR; en laboratoire, la RBP de ces espèces interagit avec la TTR humaine (Zapponi *et al.*, 1992).

Il semble que la sécrétion cellulaire de RBP soit un processus hautement régulé. Les processus impliqués dans cette régulation ne sont pas encore totalement expliqués, mais un des facteurs qui contrôle la sécrétion de RBP est le niveau de rétinol présent dans l'organisme. En effet, il a été démontré que la sécrétion hépatique de RBP est bloquée chez les animaux déficients en vitamine A. Ainsi, il y a accumulation de cette protéine dans le foie alors que les niveaux plasmatiques diminuent considérablement (Muto *et al.*, 1972). Par contre, le taux de biosynthèse de la RBP n'est pas influencé par le statut alimentaire en vitamine A (Soprano *et al.*, 1982).

Pour expliquer le mécanisme d'incorporation du rétinol par les cellules des tissus cibles, trois hypothèses sont suggérées. Tout d'abord, il est possible que le rétinol se dissocie de la RBP, circule dans la phase aqueuse et rejoigne la CRBP sans qu'il n'y ait interaction entre la RBP et un récepteur de surface cellulaire. Dans ce modèle, le transfert du rétinol entre le plasma et les cellules cibles s'effectue selon un gradient de concentrations (Hodam et Creek, 1998). Cependant, les différents types de cellules ont des demandes très spécifiques en rétinol. Il apparaît alors difficile, pour un mécanisme de transport si peu régulé, de répondre aux demandes exactes des différentes cellules (Newcomer et Ong, 2000). Il se pourrait donc que la holo-RBP (RBP liée au rétinol) se lie à un récepteur à la surface de la cellule cible. Le rétinol serait alors libéré pour se diriger à l'intérieur de la cellule. L'apo-RBP (RBP libre) serait, quant à elle, libérée dans la circulation pour être ensuite dégradée ou recyclée

par les reins (Sundaram *et al.*, 1998). Finalement, il est aussi possible que la holo-RBP soit internalisée par endocytose par l'implication d'un récepteur. Le rétinol serait relâché à l'intérieur de la cellule et l'apo-RBP retournerait dans la circulation sanguine avant d'être dégradée par les reins (Sporn *et al.*, 1994; Olson, 1986).

Une fois que le rétinol a été livré aux cellules cibles, la RBP pourrait être recyclée dans les reins. Il a été démontré que la RBP se lie à la mégaline, une protéine membranaire située dans les tubules proximaux et impliquée dans la réabsorption de nombreuses protéines. Ainsi, chez des souris ne possédant pas le gène de la mégaline, on retrouve la RBP dans les tubules proximaux alors qu'on ne la retrouve pas chez des souris normales (Christensen *et al.*, 1999). Un gradient d'absorption a aussi été remarqué. En effet, l'absorption est très intense dans la partie initiale des tubules proximaux et diminue dans les segments suivants. Dans le segment trois des tubules proximaux, l'absorption est presque nulle. C'est donc dire que la RBP serait réabsorbée rapidement par les tubules tout de suite après la filtration glomérulaire (Christensen et Willnow, 1999). Plus récemment, il a été établi que la mégaline et la cubiline, une autre protéine membranaire, agissent en synergie afin de réabsorber la RBP (Christensen et Birn, 2001). La mégaline agirait également dans la réabsorption de la TTR dans les tubules proximaux des reins (Mendes Sousa *et al.*, 2000).

Le rétinol absorbé par les cellules des tissus cibles est converti en ses formes actives, c'est-à-dire l'acide rétinoïque et le 11-*cis*-rétinal (Gamble *et al.*, 2001). L'acide rétinoïque se lie aux récepteurs nucléaires des rétinoïdes ce qui engendre une modulation de l'expression de certains gènes (Sucov et Evans, 1995). Le 11-*cis*-rétinal, pour sa part, constitue le chromophore de la rhodopsine, un pigment visuel (Kochendoerfer *et al.*, 1999 ; Wald, 1968).

1.3.5 Impact des contaminants sur les protéines de transport

Très peu de littérature existe quant aux concentrations de RBP dans le plasma d'animaux qui vivent dans des milieux contaminés. Cependant, certaines substances peuvent influencer le transport du rétinol. Par exemple, l'administration d'œstrogène induit la synthèse d'ARNm de RBP chez les mâles de l'espèce *Xenopus laevis* (Urbatzka *et al.*, 2007; Levy *et al.*, 2004) alors que l'administration d'androgène ou d'anti-œstrogènes semble plutôt inhiber cette synthèse (McKearin et Shapiro, 1988). Chez le poisson, les niveaux plasmatiques de RBP diminuent suite à une injection d'œstradiol (Funkenstein, 2001) et des souris déficientes pour le gène de la RBP possèdent de plus faibles concentrations plasmatiques en rétinol que les souris normales. Le phénotype de ces souris est intéressant car elles possèdent des réserves hépatiques de vitamine A plus élevées que la normale, mais dépendent néanmoins d'une alimentation continue en vitamine A (Quadro, 1999). C'est donc comme si elles étaient incapables de mobiliser le rétinol hépatique pour le transporter aux tissus cibles, une situation qui ressemble à ce qui a été observé dernièrement chez les ouaouarons de la Yamaska.

Plusieurs recherches indiquent que des contaminants comme les BPC (biphényles polychlorés) et les furannes possèdent une affinité pour la TTR, se traduisant par une baisse des concentrations en hormones thyroïdiennes dans le plasma. Selon les auteurs de ces recherches, Brouwer et van den Berg (1986), Letcher *et al.* (2000) et Ishihara *et al.* (2003), les BPC utiliseraient le site de liaison des hormones thyroïdiennes diminuant, par le fait même, l'efficacité de leur transport. Il a également été établi que des polluants, tels que les dérivés chlorés des nonylphénols et du bisphénol A, lient la TTR chez les têtards de ouaouarons (Yamauchi *et al.*, 2003). Or, les nonylphénols, qui sont employés comme surfactants dans certaines formulation de pesticides, ont été détectés dans les étendues d'eau du bassin de la Rivière Yamaska (Berryman *et al.*, 2003). Ainsi, ces composés agissent comme des

perturbateurs endocriniens (Levy et al., 2004). La présence de ces contaminants pourrait peut-être expliquer la baisse des concentrations d'hormones thyroïdiennes dans le plasma des animaux exposés. Cette situation pourrait provoquer une altération du transport du rétinol, en diminuant l'affinité de la TTR pour la RBP, ou, tout simplement, en rendant les sites de liaison pour la RBP inaccessibles. Une étude intéressante fait le lien entre cette baisse et la diminution probable de rétinol. En effet, la liaison de ces composés à la TTR pourrait affecter le transport du rétinol en empêchant la formation du complexe comprenant la TTR et la RBP. En fait, les métabolites des composés organochlorés déplaceraient l'hormone T₄ de son site de liaison sur la TTR et engendreraient un changement de conformation de la protéine qui réduit son affinité pour le complexe rétinol-RBP (Lans *et al.*, 1993; Brouwer et Van den Berg, 1986). Il est aussi possible que la liaison de ces contaminants à la TTR rende inaccessible le site de liaison de la RBP, ce qui entraînerait la même conséquence.

Une diminution de la concentration de rétinol et de RBP dans le plasma des souris ne possédant pas le gène de la TTR a aussi été rapportée (Waits *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1995; Episkopou *et al.*, 1993). Malgré tout, les concentrations en esters de rétinol et de rétinol hépatiques chez les souris étudiées étaient identiques aux niveaux présents chez des individus normaux, ce qui suggère que la mutation n'affecte pas l'absorption ni le stockage des rétinoïdes (Wei *et al.*, 1995). La situation chez ces souris est donc presque identique à celle que l'on observe chez les ouaouarons provenant de la rivière Noire au cours des dernières années. Il a aussi été établi que lors d'une inflammation, il y a diminution de la sécrétion de TTR ce qui résulte en une augmentation de la filtration glomérulaire de RBP et une baisse concomitante du rétinol plasmatique (Soprano et Blaner, 1994). Par ailleurs, une étude *in vivo* réalisée chez *Xenopus laevis* démontre qu'une exposition à des substances avec des propriétés oestrogéniques provoque une diminution de la synthèse d'ARNm de TTR dans le foie (Urbatzka *et al.*, 2007). Ainsi, une exposition à des substances oestrogéniques chez

Xenopus laevis provoquerait une baisse de la synthèse de TTR et une hausse de la synthèse de RBP (Urbatzka *et al.*, 2007). Comme la TTR est nécessaire au transport de la RBP, on peut supposer que la hausse de la synthèse de RBP serait accompagnée d'une hausse de la filtration glomérulaire de cette protéine.

1.4 Objectifs et hypothèses

L'impact de contaminants (principalement des organochlorés) sur l'homéostasie des rétinoïdes est bien documenté pour certaines classes animales. C'est notamment le cas chez les oiseaux (Champoux *et al.*, 2006; Boily *et al.*, 1994), les mammifères (Tornero *et al.*, 2006; Skaare *et al.*, 2001; Simms et Ross, 2000a) et les poissons (Boyer *et al.*, 2000; Besselink *et al.*, 1998). Cependant, nous ne connaissons pas l'impact de plusieurs produits utilisés en agriculture sur les rétinoïdes et nous ne connaissons pas bien le système des rétinoïdes des grenouilles. Certaines études ont déjà été effectuées sur les effets de contaminants chez cette classe de vertébrés (King *et al.*, 2007; Coady *et al.*, 2005; Gropelli *et al.*, 2005; Christin *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2002; Ouellet *et al.*, 1997). Par contre, très peu de recherche portent sur l'impact des polluants sur l'homéostasie des rétinoïdes, une piste pourtant très intéressante qui pourrait expliquer, du moins en partie, le déclin des grenouilles incluant les altérations du développement embryonnaire. Les contaminants agricoles semblent toutefois affecter le métabolisme des rétinoïdes chez les grenouilles dans des études réalisées sur le terrain (Bérubé *et al.*, 2005; Boily *et al.*, 2005) et au laboratoire (Leiva-Presa *et al.*, 2006).

1.4.1 Impact sur le métabolisme des rétinoïdes

Les résultats obtenus jusqu'à maintenant en ce qui concerne l'impact de l'agriculture sur les rétinoïdes des ouaouarons associés à une forte intensité agricole tendent à démontrer que les concentrations plasmatiques sont faibles (Bérubé *et al.*, 2005) sans réel changements sur les réserves hépatiques (Boily *et al.*, 2009). Il est

possible de supposer que la baisse de rétinol plasmatique observée chez les mâles depuis 2003 pourra de nouveau être détectée pour les ouaouarons échantillonnés en 2007 et en 2008. Mon premier objectif sera donc de mesurer les concentrations plasmatiques et hépatiques de rétinol ainsi que les concentrations d'esters de rétinol hépatiques chez les mâles échantillonnés en 2007 et en 2008.

Cependant, le profil des concentrations en rétinoïdes des femelles n'a jamais été établi et il serait intéressant de voir si celles-ci sont affectées de la même manière que les mâles par la contamination d'origine agricole. **Les femelles devraient ainsi présenter une baisse du rétinol plasmatique dans les sites de forte intensité agricole.** Afin de vérifier cette hypothèse, mon deuxième objectif sera de mesurer les concentrations plasmatiques et hépatiques de rétinol ainsi que les concentrations d'esters de rétinol hépatiques chez les femelles échantillonnées en 2007 et en 2008.

1.4.2. Impact sur le transport du rétinol

Selon les résultats obtenus jusqu'à maintenant, les ouaouarons vivant dans des sites agricoles contaminés voient leur rétinol plasmatique diminuer malgré un stockage hépatique qui semble adéquat. Dès lors, une des hypothèses de mon projet de recherche est la suivante: **La faible concentration du rétinol plasmatique des ouaouarons échantillonnés à des sites agricoles contaminés est due à un problème de transport impliquant la liaison avec la protéine RBP.** Étant donné que la concentration plasmatique de rétinol est influencée non seulement par la liaison avec la RBP mais aussi par la formation d'un complexe avec la TTR, mon premier objectif sera de mesurer les concentrations de RBP et de TTR dans le plasma des ouaouarons. On s'attendra à ce que les grenouilles des sites contaminés aient une concentration plus faible de RBP ou de TTR, ce qui laisserait supposer un déséquilibre dans la formation du complexe RBP-ROH-TTR. Une telle conséquence pourrait être attribuable à un problème de liaison du rétinol (mécanistique) ou à une altération de la synthèse hépatique de RBP ou de TTR. Les pesticides pourraient être

impliqués dans l'un ou l'autre des mécanismes. Si un problème de liaison moléculaire est plus difficile à circonscrire, la synthèse hépatique de RBP ou de TTR peut être explorée par le biais de leur ARNm respectif et constituera mon deuxième objectif. On s'attendra à ce que la mesure semi-quantitative de l'ARNm de la RBP ou de la TTR soit plus faible chez les ouaouarons des sites contaminés.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Approche expérimentale et plan d'échantillonnage

2.1.1 Présentation du matériel biologique

Dans le projet de la rivière Yamaska, les ouaouarons sont utilisés comme espèce sentinelle. Les amphibiens, de façon globale, à cause de leur sensibilité aux contaminants, sont fréquemment utilisés en tant que groupe indicateur de l'état de l'environnement. Le choix du ouaouaron est appuyé par plusieurs arguments de taille. Tout d'abord, il s'agit d'une espèce indigène et relativement sédentaire, ce qui permet de s'assurer qu'elle reflète davantage les conditions locales de son environnement comparativement à des espèces plus mobiles. Le ouaouaron n'est pas une espèce en danger au Québec et il est ainsi possible de capturer des individus sans affecter les populations locales (<http://www3.mrnf.gouv.qc.ca/faune/especes/menacees/liste.asp>). Les ouaouarons possèdent également un cycle de vie majoritairement aquatique et sont donc exposés de façon chronique à des polluants présents dans l'eau (Boily *et al.*, 2005). Les œufs des grenouilles sont également très sensibles à la contamination environnementale puisqu'ils ne possèdent pas de coquille. Les embryons peuvent donc être exposés dès les premiers stades de leur développement. Par surcroît, la peau des grenouilles est perméable ce qui procure une voie d'exposition directe aux polluants. Par ailleurs, cette espèce occupe un haut niveau trophique et présente donc un fort potentiel d'exposition à des proies aquatiques contaminées. Ainsi, en plus d'une exposition directe aux polluants présents dans l'eau par les voies orales et cutanées, une bioaccumulation de divers contaminants peut survenir chez le ouaouaron dont la diète est variée et se compose principalement de petits poissons, d'amphibiens de plus petite taille et d'insectes aquatiques (Spear *et al.*, 2009). Les

ouaouarons possèdent également une longue espérance de vie allant jusqu'à 8 ou 9 ans en milieu naturel (Bruneau et Magnin, 1980), ce qui les rend susceptibles à une exposition chronique à des contaminants. Finalement, la taille corporelle des ouaouarons est plus élevée que chez les autres espèces de grenouilles ce qui permet de prélever un échantillon de sang adéquat ($\pm 0,7$ ml) par l'artère fémorale du ouaouaron sans recourir à l'euthanasie. Cette technique, non invasive, ne peut pas être utilisée chez des espèces plus petites (Bérubé *et al.*, 2005).

2.1.2 Présentation des variables biologiques

Plusieurs variables ont été utilisées lors de cette recherche. Tout d'abord, les niveaux de rétinol plasmatiques et hépatiques ainsi que les concentrations d'ester de rétinol ont été analysés afin de vérifier s'il y a bel et bien une baisse du rétinol plasmatique et une baisse du ratio esters de rétinol sur rétinol dans le foie des ouaouarons provenant de sites où l'activité agricole est omniprésente, comme des études précédentes l'ont démontrées (Boily *et al.*, 2009; Bérubé *et al.*, 2005). Les niveaux hépatiques d'esters de rétinol permettent aussi d'évaluer la réserve de rétinoïdes chez les grenouilles des différents sites. Ensuite, afin de valider l'hypothèse selon laquelle le transport peut être un facteur déterminant, nous avons tenté de mesurer les niveaux plasmatiques de RBP et la synthèse de cette protéine dans le foie (ARNm). Finalement, nous avons aussi essayé de mesurer les niveaux de TTR plasmatiques afin de juger de l'influence de l'intensité des activités agricoles sur cette protéine. Tout comme la RBP, nous avons également tenté de mesurer la synthèse de cette protéine au niveau hépatique. Nous avons observé le comportement de ces principales variables continues en fonction du site, de l'année (2008 et 2009) et du sexe. Le sexe est susceptible d'influencer les autres variables. Le site de provenance a servi d'indicateur pour savoir si les niveaux des variables continues sont affectés par l'intensité de l'agriculture et les résultats des deux années nous ont permis de voir si

des changements surviennent d'une année à l'autre. En outre, plusieurs autres mesures ont été effectuées sur les ouaouarons et ont été utilisées lors des analyses statistiques. Ainsi, la longueur totale, le poids, la LMC, la longueur du tibia, le diamètre du tympan, le poids du foie et la couleur de la gorge ont été relevés pour chaque individu. La LMC a été retenue de préférence au poids des ouaouarons puisque celui-ci est très dépendant du contenu stomacal et représente donc une mesure évoquant un état temporaire. La mesure de la LMC représente donc un paramètre beaucoup plus stable dans le temps et permet de mieux faire ressortir les différences de croissance pouvant être observées entre les sites. Les rétinoïdes étant impliqués dans la croissance, il est aussi très important d'évaluer si celle-ci est influencée par l'intensité agricole.

2.1.3 Sites à l'étude

La rivière Yamaska prend sa source dans le Lac Brome et son embouchure est située au niveau du Lac Saint-Pierre. Le bassin de la rivière Yamaska possède une superficie totale de 4784 km². L'agriculture prédomine sur plus de 50 % de l'ensemble de ce territoire. Au cours des étés 2007 et 2008, 6 cours d'eau de ce bassin ont été échantillonnés. Les sites à l'étude ont été sélectionnés afin de former un gradient d'activité agricole déterminé par le pourcentage des terres occupées par la culture à grandes interlignes (maïs et soya) tel que défini par Primeau *et al.* (1999). Deux sites proviennent de régions où l'agriculture est peu intense (0 à 19 %), trois sites de zones où l'intensité agricole est intermédiaire (20 à 59 %) et un site d'un territoire où l'agriculture est prédominante (> 60%). Les analyses d'eau de surface pour les pesticides et les nutriments, effectuées par le CEAEQ, viennent appuyer ce classement (tableaux A.1 à A.4). Les sites de faible intensité agricole sont ceux de Deborah Stairs et du Lac Boivin, les sites de moyenne intensité agricole sont ceux des rivières Pot-au-Beurre et Yamaska (anciennement appelé le site de Farnham: FA) et du réservoir Choinière alors que la rivière Noire représente le site de haute intensité

agricole (figure 2.1). Tous les emplacements, sauf le site Yamaska à Farnham (bassin versant principal) sont des sous-bassins versants de la rivière Yamaska. C'est donc dire que les sites sont représentatifs des caractéristiques locales en ce qui concerne l'activité agricole et l'utilisation de pesticides. Le site de Deborah Stairs est un petit étang de 2,5 acres situé dans une petite zone forestière protégée. Le site du Lac Boivin est échantillonné au Centre de la Nature, un milieu protégé où se trouve un centre d'interprétation de la nature. La rivière Yamaska est une petite zone protégée qui fait partie de la municipalité de Farnham. Cette partie de la rivière se situe en aval et tout près d'une région où l'agriculture intensive occupe entre 40 et 59 % du territoire. Cependant, le site est influencé par trois tributaires qui drainent des zones partiellement forestières. Le réservoir Choinière est une grande étendue d'eau de 4,7 km². Il s'agit d'un tributaire de la Yamaska et on y a souvent retrouvé, par le passé, des fleurs d'eau résultant de la présence de cyanobactéries. Ce réservoir constitue l'une des principales zones de villégiature retrouvées dans le bassin de la rivière Yamaska. Des champs en culture sont recensés aux abords de ce réservoir ce qui entraîne une pollution par des substances nutritives et de la matière organique entre autres. D'ailleurs, aucune espèce de poissons intolérants à la pollution et très peu de menés insectivores (un groupe de poissons sensibles à la pollution du milieu) ne se retrouvent en aval du réservoir¹. La rivière Pot-au-Beurre fait partie de la baie Lavallière, une réserve de terres humides de 1400 âcres. Le sous-bassin versant est occupé par différents types de fermes et cultures (bovins, porcs, volaille, maïs et soya) et est cultivé sur environ de 20 à 29 % de sa surface. Le sous-bassin de la rivière Noire est cultivé sur plus de 60 % de sa surface. On y retrouve de grands champs de maïs et de soya ainsi que des élevages de porcs et de volaille.

¹ http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/eco_aqua/yamaska/yamasup.htm

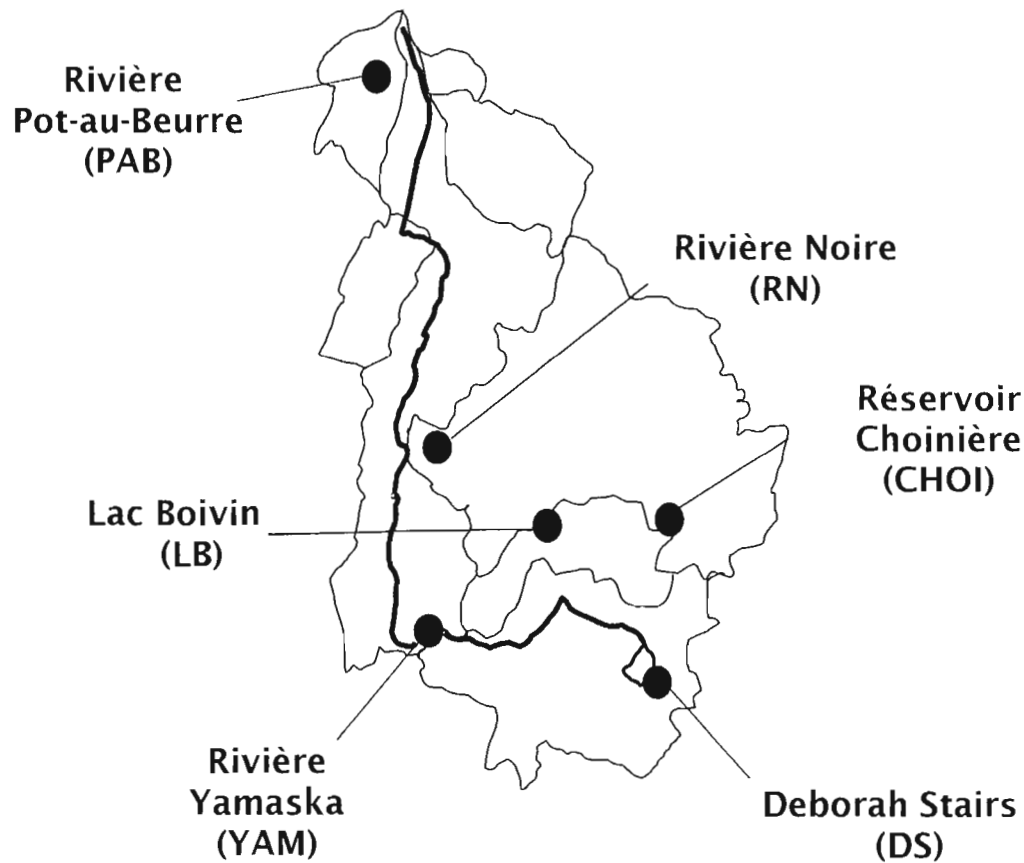


Figure 2.1 : Sites à l'étude dans le bassin de la rivière Yamaska. Les sites de faible intensité agricole sont ceux de Deborah Stairs et du Lac Boivin, les sites de moyenne intensité agricole sont ceux des rivières Pot-au-Beurre et Yamaska et du réservoir Choinière alors que la rivière Noire représente le site de haute intensité agricole.

2.1.4 Échantillonnage

À chaque site, entre 14 et 32 ouaouarons (mâles et femelles) ont été capturés entre 21 h et 2 h. Pour chacune des deux années d'échantillonnage, les captures ont eu lieu entre la mi-juin et la fin juillet, après le coucher du soleil et dans la période de reproduction des ouaouarons. Ainsi, les mâles ont été plus fréquemment capturés puisque le chant des ouaouarons constitue la principale façon de les repérer sur les cours d'eau. Une fois repérés, les ouaouarons ont été aveuglés par une lumière (120 w) et capturés directement à la main ou avec un filet. Les grenouilles (maximum de 6 individus) ont ensuite été placées dans des bacs de plastique (40 X 75 X 55 cm) avec

un peu d'eau du site (environ 8 cm). Des petits trous dans les bacs permettaient une bonne aération et des attaches étaient placées sur le couvercle afin d'empêcher les prédateurs de s'attaquer aux grenouilles. Les contenants étaient ensuite placés sous la végétation jusqu'à l'arrivée de l'équipe de terrain tôt le lendemain. Les manipulations sur les grenouilles ont été effectuées dans un laps de temps maximal de 16 heures et la température de l'eau à l'intérieur des bacs a été maintenue entre 15 °C et 25 °C. Les grenouilles ont été anesthésiées individuellement dans de l'eau contenant 0,1 % de MS222 (tricaine methanesulphonate; ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA) tamponné avec 0,2 % de NaHCO₃ (Fisher Scientific, Montréal, Qc, Canada). Les ouaouarons ont ensuite été pesés et mesurés; longueur totale ainsi que distance entre museau et cloaque (LMC). Le sexe des animaux a été déterminé et un examen sommaire a été réalisé afin de détecter des anomalies physiologiques. Le niveau de maturité des individus mâles a été déterminé à l'aide de la couleur de la gorge selon une échelle de couleur allant de 1 à 11. Une prise de sang a été effectuée sur tous les individus dans l'artère fémorale ou, le cas échéant, de façon intracardiaque. Le sang entier a été mis sur la glace (10 min, à l'abri de la lumière) pour ensuite être centrifugé (11 000 rpm, 2 minutes), puis conservé à -80 °C jusqu'à l'analyse des rétinoïdes. À chacun des sites, 12 ouaouarons ont été euthanasiés afin de prélever le foie, stabilisé dans l'azote liquide et entreposé à -80 °C jusqu'à ce que les analyses des rétinoïdes soient effectuées. Le niveau de maturité et, parfois le sexe, ont pu être confirmés par le développement des organes sexuels, c'est-à-dire par la présence de testicules et des corps gras chez les mâles et par la présence d'ovaires bien développés et d'œufs matures chez les femelles. La capture et la manipulation des animaux sur le terrain étaient conformes aux permis délivrés par le ministère des Ressources naturelles et de la faune du Québec et par le Comité Institutionnel de protection des animaux de l'Université du Québec à Montréal (CIPA). Tous les membres de l'équipe ont suivi une formation adéquate pour la manipulation d'animaux, conforme au CIPA ou l'équivalent.

2.2 Méthodes analytiques

2.2.1 Extraction et détection des rétinoïdes hépatiques

Afin d'extraire les rétinoïdes du foie des ouaouarons, la procédure d'extraction modifiée de Spear et Moon (1986) a été utilisée. Tous les produits chimiques et les solvants ont été obtenus chez Fisher Scientific (Montréal, Qc, Canada). Le cas échéant, la provenance apparaît entre parenthèses. En résumé, environ 0,2 g de foie de ouaouaron a été déshydraté en le broyant avec environ 2 g de Na₂SO₄ (sulfate de sodium anhydre). Le mélange poudre-foie (2 g) a été placé dans une éprouvette en verre avec bouchon. Ensuite, 5 ml d'hexane ont été ajoutés et le tube a été installé sur un mixeur rotatoire pendant 10 minutes. Après une centrifugation de 5 minutes à 2000 X g, un aliquot de 500 µl a été prélevé et évaporé à sec (45°C) sous un faible jet d'azote gazeux. L'extrait a été resuspendu dans 200 µl d'acétonitrile et 50 µl de cette solution ont été injectés au HPLC.

Les conditions d'analyse au HPLC sont identiques à celles décrites par Doyon *et al.* (1998) à l'exception de l'utilisation d'une colonne analytique Inertsil 018-80A (5 µm pour la taille des particules, 34,6 X 150 mm). Brièvement, le détecteur d'absorbance UV a été ajusté à 326 nm, ce qui correspond au maximum d'absorbance du tout-*trans*-rétinol. La pompe (System Gold programmable solvent module 126) et le détecteur (System Gold diode array detector module 168) ont été installés sur un ordinateur fonctionnant avec le programme System Gold V810: The personal chromatograph. La détection des rétinoïdes a été réalisée avec deux solvants (1,5 ml par minute). Tout d'abord, le solvant A: eau et d'acétonitrile dans un rapport de 90:10, permettait d'éluer le déhydrorétinol et le rétinol. Après 2 minutes, le solvant A était changé pour le solvant B (pendant 1 min): méthanol, tétrahydrofurane et eau dans un rapport 57:36:7. Ce dernier mélange permettait l'élution des rétinoïdes estérifiés. Les pics de rétinol et de palmitate de rétinol ont été identifiés en comparant leur temps de rétention et leurs propriétés spectrales avec ceux de standards

chimiques commerciaux. La quantification a été réalisée en utilisant l'équation de régression linéaire obtenue avec les standards de rétinoïdes à différentes concentrations. Afin d'estimer les autres composés rétinoïdes pour lesquels nous n'avons pas de standard, un facteur de correction, basé sur le poids moléculaire de la molécule par rapport à celui du rétinol ou du palmitate de rétinol, a été utilisé.

2.2.2 Extraction et détection des rétinoïdes plasmatiques

Les rétinoïdes du plasma ont été quantifiés selon la méthode décrite par Bérubé *et al.* (2005). À 200 µl de plasma (décongelé pendant environ 30 minutes sur la glace), 200 µl de méthanol contenant de l'hydroxytoluène butylé (BHT) à 0,1 % ont été ajoutés ainsi que 1 ml du mélange de solvants suivant: acétate d'éthyle et hexane (50:50 contenant 0,068 % d'acide acétique glaciale). Le mélange a ensuite été brassé vigoureusement pendant 1 minute et centrifugé à 2000 X g pendant 5 minutes. Finalement, 800 µl de la phase organique ont été récupérés dans un tube propre. L'extraction a été répétée une deuxième fois et 1 ml de la phase organique a été récupéré. Puis, pour s'assurer de la récupération des rétinoïdes les moins polaires, une troisième extraction a été réalisée avec 1 ml d'hexane contenant 0,068% d'acide acétique glaciale afin de recueillir, encore une fois, 1 ml de la phase organique. Les trois phases organiques récupérées précédemment ont été combinées avant d'être évaporées jusqu'à assèchement à 45°C dans un évaporateur/condensateur (Eppendorf vacufuge plus). Le tube (fermé sous un faible jet d'azote gazeux) a été conservé jusqu'à trois heures à -20 °C avant l'analyse au HPLC. Cinq minutes avant l'analyse au HPLC le tube a été équilibré à la température de la pièce et l'extrait a été dissous dans 100 µl d'acétonitrile. Un volume de 80 µl a été injecté dans un système HPLC, phase inverse (Water Corporation, Milford, MA, USA), constitué d'un programme Millenium 32 (version 3.05.01) installé sur un ordinateur pentium II, d'une pompe de modèle 510, d'un détecteur d'absorbance de modèle 486 ajusté à une longueur d'onde de 350 nm et d'un injecteur de modèle 7725i (Rheodyne). La colonne analytique

utilisée pour la séparation était une Inertsil C18 (Chromatographic Sciences Company, Brockville, Ont., Canada; 150A-ODS2; 250 mm X 4,6 mm; taille des particules de 5 μ m). Une seule phase mobile a été utilisée, constituée d'un mélange de méthanol (25,8%), d'acétonitrile (55,7%), de tétrahydrofuranne (2,5%) et d'acide trifluoroacétique à 0,35mM (16%). La vitesse d'élution de la phase mobile était de 1 ml par minute. Les rétinoïdes ont été identifiés et quantifiés en comparant les pics obtenus avec ceux produits par des standards commerciaux. Toutes les analyses mentionnées aux points 2.2.1 et 2.2.2 ont été effectuées sous une lumière incandescente jaune afin de prévenir l'isomérisation et la dégradation des rétinoïdes.

2.2.3 Extraction et détection de la RBP et de la TTR dans le plasma

Nous avons utilisé la méthode élaborée par Burri et Kutnink (1989) pour quantifier la RBP et la TTR plasmatiques. Cette méthode permet de déterminer les quantités de holo-RBP libre et du complexe holo-RBP-TTR dans le plasma des organismes. Le plasma (100 μ l) a été dilué 4 fois dans une solution saline isotonique (150 mmol/l de NaCl) et filtré en utilisant un filtre de 0,2 μ m (Millex filter™, Billerica, MA, USA). L'étape de filtration a été effectuée pour les premières analyses, mais abandonnée par la suite car sans influence sur les résultats. Pour terminer, 100 μ l de plasma ont été injectés directement dans le système HPLC Waters (décrit plus haut), muni d'une colonne analytique de type Shodex KW-803 (30 cm X 8 mm) et d'une pré-colonne Shodex KW-G (5 cm X 6 mm). Les longueurs d'onde 330 nm (rétinol) et 280 nm (TTR liée à la RBP) ont été utilisées. La phase mobile (0,5 ml/min) consistait en un mélange de 150 mM de phosphate de sodium, 1 mM EDTA et 2 mM de mercaptoéthanol (Bioshop, Burlington, Ont. Canada), pH 7,0. L'identification des pics obtenus a été réalisée en comparant avec des standards de poids moléculaire (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ainsi qu'avec un standard de RBP humaine (MP Biomedicals, Solon, OH). Une autre phase mobile composée de 0,1 M

Na_2SO_4 , 0,1 M KH_2PO_4 et 0,05 % d'azoture de sodium a été testée. Le pH de cette solution était ajusté à 6,0 avec du NaOH (Fisher Scientific, Montréal, Qc, Canada).

Puisqu'il semblait y avoir des protéines en plus grandes quantités que la RBP et la TTR et que ces protéines semblaient camoufler la RBP et la TTR, nous avons décidé de récolter des fractions afin d'en extraire la RBP et la TTR. Un total de 20 fractions ont été récoltées (périodes de 30 secondes, volume de 250 μl) entre 15 et 25 minutes dans des tubes de verres contenant un mélange de 250 μl de méthanol avec BHT (0,11 %) et de 50 μl d'acide ascorbique 19.9 μM (antioxydant). L'extraction des rétinoïdes a été réalisée comme pour le plasma mais avec 1ml d'hexane contenant 0,068% d'acide acétique glaciale et en faisant deux extractions au lieu de trois. L'extrait a été resuspendu dans 50 μl d'acétonitrile et 30 μl ont été injectés dans le système HPLC munie d'une boucle de 20 μl .

Finalement, nous avons choisi de dissocier le complexe TTR-RBP-rétinol avant d'injecter au HPLC. Cette tentative a été effectuée avec un échantillon de plasma humain. Nous avons mélangé 50 μl de plasma avec 50 μl d'éthanol afin de précipiter les protéines. Par la suite, 50 μl d'eau ultra-pure ont été ajoutés afin de dissocier la TTR du complexe RBP-rétinol et 200 μl d'hexane ont servi afin d'extraire le rétinol. La solution a été mélangée vigoureusement pendant une minute et centrifugée à 2000 X g pendant 5 minutes afin de compléter l'extraction. Un volume de 160 μl de la phase supérieure a ensuite été prélevé et évaporé à sec à 45°C. L'extrait a été dissout dans 30 μl d'éthanol pour injection dans le système HPLC.

2.2.4 Extraction de l'ARN du foie et RT-PCR

Afin d'extraire l'ARN du foie, 2 ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ont été ajoutés à 0,2 g de foie. Un homogénéiseur de type Polytron PT 1600E a ensuite été utilisé afin de broyer l'homogénat. L'homogénat a été centrifugé à 4°C à

12 000 X g pendant 10 minutes. Le surnageant a été prélevé pour être transféré dans un tube de type eppendorf (10 ml) traité pour enlever la RNase. La solution a ensuite été incubée entre 15 °C et 30 °C pendant 5 minutes afin de permettre une dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. Ensuite, 400 µl de chloroforme ont été ajoutés à l'échantillon, suivi d'un mélange vigoureux pendant 15 secondes et d'une incubation de 2 à 3 minutes entre 15 °C et 30 °C. Le mélange a, par la suite, été centrifugé pendant 15 minutes à 12 000 X g entre 2 °C et 8 °C. La phase aqueuse supérieure contenant l'ARN a été récupérée et transférée dans deux nouveaux tubes de type eppendorf traités pour enlever la RNase. L'ARN a ensuite été précipité par l'ajout de 0,5 ml d'alcool isopropylique dans chaque tube. La solution a été incubée pendant 10 minutes entre 15 °C et 30 °C puis centrifugée pendant 10 minutes à 12 000 X g entre 2 °C et 8 °C. Le surnageant a été retiré et le culot lavé avec 1 ml d'éthanol à 75 % pour récupérer l'ARN. L'échantillon a été mélangé au vortex et centrifugé pendant 5 minutes à 7500 X g entre 2 °C et 8 °C. Le surnageant a encore une fois été enlevé et le culot séché à 37 °C pendant environ 45 minutes. Lorsque complètement sec, le culot a été dissout dans 50 µl d'eau traitée sans RNase. Finalement, l'extrait a été incubé dans un bain-marie entre 55 °C et 60 °C pendant 10 minutes pour solubiliser le culot. Les contenus des deux tubes ont été combinés et l'absorbance lue à 260 nm et 280 nm pour la qualité de l'extraction. Un ratio A260/A280 entre 1,5 et 1,7 a été considéré satisfaisant. La qualité de l'ARN fut aussi vérifiée sur un gel d'agarose 1 % contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. L'extrait a par la suite été conservé à -80 °C jusqu'à l'analyse RT-PCR. Il importe de noter que les instruments utilisés pour l'extraction (couteau, pinces et tige du l'homogénéiseur) ont été bien nettoyés avant chaque extraction par trempage dans du NaOH 1 M pendant quatre heures, puis par rinçage avec de l'eau traitée sans RNase avant d'être stérilisés pendant 30 minutes à 121 °C.

Pour l'analyse en RT-PCR, l'extrait a été décongelé pendant environ 30 minutes sur la glace. Nous avons mélangé 3 µl de tampon RT 10X, 3 µl de mélange

dNTP 5 mM, 3 µl d'hexamènes 10 µM, 0,5 µl d'inhibiteur de RNase 1000 U, 1,5 µl d'enzyme omniscrypt RT 4U/µl, un volume contenant 3 µg d'extrait d'ARN et nous avons complété à 30 µl avec de l'eau sans RNase. L'ensemble de solutions nécessaires au RT-PCR provenaient de chez Qiagen, Mississauga, Ont., Canada. Le mélange a été incubé à 37°C pendant une heure puis à 42°C pendant 45 minutes (afin d'obtenir une activité enzymatique maximale) dans un bain chauffant sec. Ces deux dernières étapes ont permis l'obtention d'un produit RT.

Les étapes subséquentes ont été réalisées sur glace afin de ne pas dégrader le produit PCR. Dans un tube pour PCR, nous avons préparé un mélange contenant 5 µl de produit RT, 2 µl d'amorces sens et 2 µl d'amorces anti-sens pour chacune des amorces à tester (actine de *Rana catesbeiana*, TTR de *Rana catesbeiana*, RBP de *Xenopus laevis* et facteur d'élongation 1-α de *Xenopus laevis*). Les amorces ont été achetées chez Eurofins (Des Moines, IA, USA). Aucune amorce de RBP n'a été synthétisée pour le ouaouaron, malgré tout, puisque la RBP est une molécule particulièrement bien conservée au cours de l'évolution (Zapponi *et al.*, 1992) et que les deux espèces de grenouilles possèdent une bonne proximité génétique, l'amorce de *Xenopus laevis* devrait pouvoir reconnaître la RBP de ouaouaron. Le facteur d'élongation 1-α de *Xenopus laevis* est pour sa part couramment utilisé en tant que standard interne (Levy *et al.*, 2004). Ensuite, ont été ajoutés à chaque tube, 5 µl de tampon PCR 10X, 1 µl de mélange de dNTP, 34,75 µl d'eau traité pour éliminer la RNase et 0,25 µl de l'enzyme Taq polymérase pour obtenir un volume final de 50 µl pour chaque amorce testée. Avant de procéder à la réaction PCR, chaque échantillon a été centrifugé brièvement afin de bien mélanger tous les constituants. En ce qui à trait à la réaction PCR, une étape initiale de dénaturation a été effectuée pendant 180 s avant une série de 40 cycles à 94°C pendant 60 s (étape de dénaturation), à 58°C pendant 30 s (étape d'hybridation des amorces) et à 72°C pendant 60 s (étape d'élongation). Suite à ces 40 cycles, nous avons procédé à une étape d'élongation

pendant 420 s à 72°C. Finalement, le produit PCR (10 µl) a été vérifié sur un gel d'agarose 2 % contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium.

Deux types de blanc ont été utilisés dans les analyses de RT-PCR. Tout d'abord, un blanc de réaction a été effectué avec chacun des échantillons analysés. Pour ce faire, la procédure a été semblable à celle mentionnée dans les paragraphes précédents à l'exception que le produit RT a été remplacé par de l'eau traitée pour enlever la RNase juste avant l'étape du PCR. Pour faire ces blancs, les amorces sens et anti-sens d'actine ont été ajoutés. Comme il n'y a pas de produit RT, ce blanc permettait de nous assurer qu'il n'y avait pas de contamination dans les solutions utilisées et que les bandes qui apparaissaient suite à l'analyse, provenaient bien de notre échantillon. L'autre blanc n'a pas été effectué systématiquement, mais a été fait à quelques reprises pendant les analyses. Il s'agissait en fait de remplacer l'enzyme omniscrypt RT 4U/µl par de l'eau traitée pour enlever la RNase. Par la suite, la procédure normale s'est poursuivie en utilisant les amorces sens et anti-sens d'actine pour le PCR. Ce blanc a permis de vérifier la présence d'ADN génomique dans l'extrait de base.

À une certaine étape des expérimentations, nous avons remarqué que nous avions peut-être une contamination à l'ADN génomique dans nos échantillons. Nous avons donc décidé de procéder à un traitement à la DNase entre l'étape d'extraction et la transcriptase reverse. Pour ce faire, 0,5 µl de DNase et 1 µl de tampon ont été ajoutés à un volume contenant 1 µg d'extrait. On complétait ensuite le volume de la solution jusqu'à 10 µl/µg d'extrait avec de l'eau traitée pour éliminer la RNase. Le mélange a ensuite été chauffé à 37°C pendant 10 minutes puis à 75°C pendant 10 minutes dans un bain chauffant sec. Par la suite, la procédure était en général la même que mentionnée précédemment à quelques exceptions près. En effet, afin d'avoir 3 µg d'extrait pour le RT, nous devions prendre un volume de 30 µl d'extrait traité à la DNase. Cela posait un problème puisque le volume de notre mélange pour le RT

devait être de 30 μ l. Nous avons donc décidé de multiplier par 1,7 les quantités des différentes substances nécessaires à l'étape du RT afin d'obtenir un volume final de 51 μ l. Ainsi, nous mélangions 5,1 μ l de tampon RT 10X, 5,1 μ l de dNTP 5 mM, 5,1 μ l d'hexamènes 10 μ M, 0,85 μ l d'inhibiteur de RNase 1000 U, 2,55 μ l d'enzyme omniscrypt RT 4U/ μ l, un volume de 30 μ l contenant 3 μ g d'extrait d'ARN traité à la DNase et nous complétions à 51 μ l avec de l'eau sans RNase (Tableau 2.1). Par la suite, afin de compenser pour la dilution effectuée à l'étape précédente, nous prenions 8,5 μ l de produit RT plutôt que 5 μ l (1,7 fois plus). Toutes les autres quantités de produits ajoutés pour le PCR sont restées inchangées à part pour l'eau traitée pour éliminer la RNase. En effet, on ajoutait seulement 31,25 μ l d'eau plutôt que 34,75 μ l afin de conserver un volume final de 50 μ l (Tableau 2.1). L'eau sans RNase utilisée dans les analyses de RT-PCR a été préparée en ajoutant 1 ml de DEPC (Sigma, Saint-Louis, MO, USA) à 999 ml d'eau ultra-pure. La solution a ensuite été mélangée quelques fois pendant la journée et laissée à la température de la pièce pendant la nuit. Le lendemain, la solution a été stérilisée au cycle liquide à 121°C pendant 1h. Une fois que celle-ci était suffisamment refroidie, un deuxième cycle de stérilisation était réalisé à 121°C pendant 45 minutes.

Tableau 2.1 : Produits utilisés lors des réactions de RT-PCR avec et sans traitement à la DNase

Étape du protocole	Produits	Échantillon non traité à la DNase	Échantillon traité à la DNase
RT	Tampon RT 10X	3 µl	5,1 µl
	Mélange dNTP 5 mM	3 µl	5,1 µl
	Hexamènes 10 µM	3 µl	5,1 µl
	Inhibiteur de RNase 1000 U	0,5 µl	0,85 µl
	Enzyme omniscrypt RT 4U/µl	1,5 µl	2,25 µl
	Extrait d'ARN	3 µg (~3 µl)	3 µg (30 µl)
	Eau traitée à la RNase	~ 16 µl	2,6 µl
	Volume total	30 µl	51 µl
PCR	Produit de RT	5 µl	8,5 µl
	Amorces sens	2 µl	2 µl
	Amorces anti-sens	2 µl	2 µl
	Tampon	5 µl	5 µl
	mélange de dNTP	1 µl	1 µl
	enzyme Taq polymérase	0,25 µl	0,25 µl
	Eau traitée à la RNase	34,75 µl	31,25 µl
	Volume total	50 µl	50 µl

2.2.5 Analyses statistiques

Un test de Wilcoxon a d'abord été réalisé pour chaque paramètre afin de voir s'il était possible de grouper les mâles et les femelles, et ce, pour chacun des sites. Les années d'échantillonnage 2007 et 2008 ont été traitées séparément. Des analyses de variances de type ANOVA ont ensuite été réalisées afin de distinguer les différences entre les sites pour chacune des variables à l'étude (rétinol plasmatique, rétinol hépatique, esters hépatiques, ratio des esters hépatique sur le rétinol hépatique, ratio du rétinol plasmatique sur le rétinol hépatique et ratio poids du foie sur LMC). Si une différence significative était détectée, un test de comparaisons multiples de Tukey était réalisé afin de voir où se situaient ces différences. Ces analyses ont été effectuées chez les mâles, chez les femelles et pour les deux sexes groupés lorsque cela était possible. Le faible nombre de femelles pour certains sites en 2007 et en 2008 n'a pas permis d'effectuer une ANOVA factorielle. Pour certains paramètres, il a été nécessaire de transformer les données (\log_{10}) afin de respecter les postulats d'application de l'ANOVA (normalité des résidus et homoscedasticité). Dans certains cas, les données aberrantes ont dû être retirées: la distance de Cook a été utilisée pour les sélectionner.

Un test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour comparer les LMC entre chacun des sites. Les mâles et les femelles, ainsi que les années d'échantillonnage, ont été traités séparément. Ce test a été préféré à une analyse de variance de type ANOVA pour ce paramètre puisque les données se sont avérées impossible à normaliser. Lorsqu'une différence significative était détectée, un test de comparaisons multiples de type Dunnett a été réalisé afin de situer entre quels sites la différence était significative. Le seuil de significativité qui a été utilisé pour chacun des tests statistique est de 0,05. Toutes les analyses ont été effectuées avec le logiciel JMP®, version 7,0 (SAS, Cary, NC, États-Unis).

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Effectifs (nombre d'échantillons) de l'étude

Les effectifs utilisés pour les analyses statistiques sont présentés au tableau 3.1. Les effectifs concernant les analyses effectuées sur les paramètres du rétinol plasmatique, du ratio poids du foie sur LMC et du LCM sont plus élevés que pour les autres paramètres. Cela s'explique simplement par le fait que, pour tous les paramètres faisant intervenir les rétinoïdes hépatiques, le foie des ouaouarons doit être prélevé et que 12 individus ont été euthanasiés à chacun des sites. Le site de Pot-au-Beurre n'a pas été inclus dans les analyses faisant intervenir les femelles pour l'année 2007 puisqu'une seule femelle a été capturée pendant l'échantillonnage. En 2008, la situation est la même pour le site du réservoir Choinière.

Tableau 3.1 : Effectifs utilisés dans les analyses statistiques selon les sites et les paramètres étudiés.

			Deborah Stairs	Lac Boivin	Réservoir choinière	Rivière Yamaska	Rivière Pot-au-	Rivière Noire
-Rétinol plasmatique -Ratio poids /SVL -SVL	2007	m	13	17	15	23	19	13
		f	5	15	7	9	ND	5
	2008	m	13	23	19	22	27	11
		f	3	7	ND	6	2	3
	2007		9	6	6	6	11	9
		f	3	6	6	6	ND	3
-Esters totaux -Ratio esters totaux/ rétinol hépatique -Ratio rétinol	2008		8	6	11	6	10	9
		f	3	6	ND	6	2	3

3.2 Comparaison mâles/femelles

Le tableau 3.2 présente les probabilités associées à un test de Wilcoxon. Ce tableau fait ressortir les différences entre les mâles et les femelles à chacun des sites. Ainsi, seulement trois différences significatives ont été dénotées. Dans tous les cas, ces différences ont été relevées chez des ouaouarons provenant du lac Boivin. Des différences significatives entre mâles et femelles apparaissent en effet pour les esters de rétinol hépatiques ($prob > |t| = 0,03$) en 2007 ainsi que pour le rétinol plasmatique ($prob > |t| = 0,04$) et pour le ratio rétinol plasmatique/rétinol hépatique ($prob > |t| = 0,01$) en 2008. Il a donc été impossible de regrouper les mâles et les femelles provenant de ce site pour ces paramètres dans les analyses de variance subséquentes. Il faut aussi noter qu'une $prob > |t|$ limite de 0,05 a été relevée pour le rétinol hépatique chez les ouaouarons de 2008. Les mâles et les femelles ont quand même été groupés dans l'analyse de variance pour ce paramètre, mais il faut garder à l'esprit que la différence entre les mâles et les femelles n'est peut-être pas négligeable.

Tableau 3.2 : Résultat des tests (Wilcoxon) faisant la comparaison entre les mâles et les femelles pour les différents paramètres à chacun des sites pour les années 2007 et 2008. Les probabilités du test sont inscrites dans le tableau. Si la probabilité est plus petite que 0,05, les groupes sont considérés comme présentant une différence significative. Les astérisques indiquent une différence significative entre les mâles et les femelles.

		Rétinol plasmatique prob > t	Rétinol hépatique prob > t	Esters de rétinol prob > t	Ratio esters de rétinol/rétinol hépatique prob > t	Ratio rétinol plasmatique/ rétinol hépatique prob > t
Deborah Stairs	2007	0,72	0,36	0,46	0,31	0,92
	2008	0,83	1,0	0,46	0,46	1,0
Lac Boivin	2007	0,45	0,47	0,03 *	0,58	0,47
	2008	0,04 *	0,05	0,38	0,30	0,01 *
Réservoir Choinière	2007	0,23	0,07	0,81	0,38	0,09
	2008	ND	ND	ND	ND	ND
Rivière Yamaska	2007	0,14	0,17	0,67	0,24	0,17
	2008	0,15	0,81	0,07	0,30	0,38
Rivière Pot-au-Beurre	2007	ND	ND	ND	ND	ND
	2008	0,92	0,45	0,07	0,11	0,59
Rivière Noire	2007	0,05	0,55	0,76	0,34	0,27
	2008	0,21	0,36	0,14	0,71	0,58

3.3 Résultats rétinoides 2007

Notre hypothèse étant que le transport du rétinol est affecté par la pollution d'origine agricole, il importe de vérifier les concentrations de rétinol plasmatique pour les ouaouarons de chacun des sites (fig 3.1). Chez les mâles, il apparaît clairement que les niveaux de rétinol plasmatique sont plus faibles à la rivière Noire. En effet, les concentrations sont significativement plus faibles à ce site par rapport à tous les autres sites ($F_{5,94} = 4,83$, $p = 0,0006$). En ce qui concerne les femelles ($F_{4,36} = 0,89$, $p = 0,48$) et l'ensemble des données ($F_{4,136} = 2,23$, $p = 0,07$), aucune différence significative n'est notée. Une tendance similaire à ce que l'on retrouve chez les mâles est par contre observée pour l'ensemble des données puisque la moyenne la plus faible est observée à la rivière Noire.

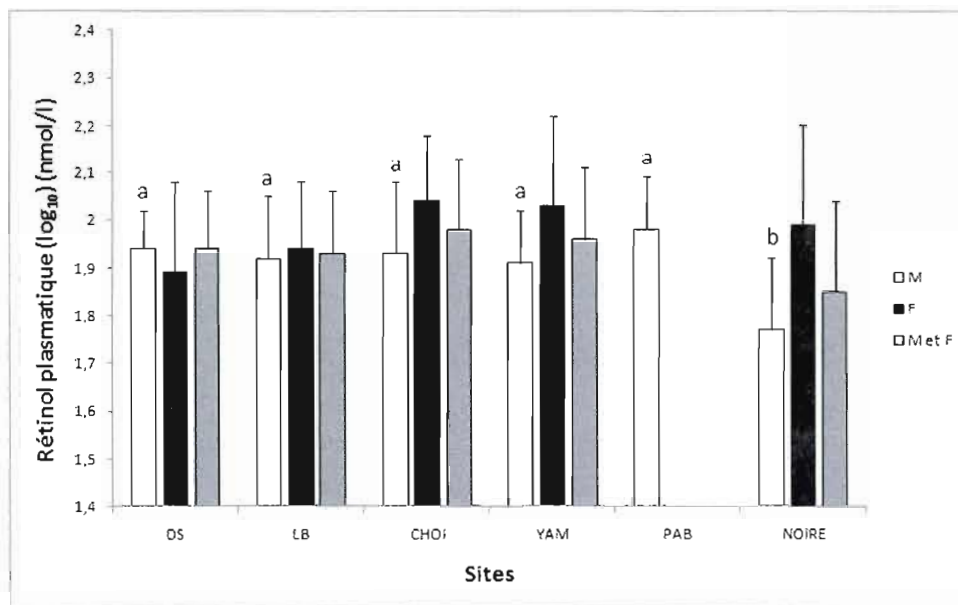


Figure 3.1 : Concentrations moyennes de rétinol plasmatique pour les mâles et femelles échantillonnés en 2007. Les barres représentent la moyenne et l'écart type ($n = 5$ à 32). Les sites ayant au moins une lettre en commun ne sont pas statistiquement différents.

La mesure des concentrations de rétinol dans le foie est essentielle. En effet, c'est dans le foie que les rétinoïdes sont emmagasinés et le rétinol représente la forme principalement sécrétée dans la circulation sanguine à partir de cet organe. Les résultats des concentrations de rétinol dans le foie en fonction des sites pour la campagne d'échantillonnage 2007 sont présentés à la figure 3.2. Ainsi, aucune différence n'est observée entre les sites, que ce soit pour les mâles, pour les femelles ou pour l'ensemble des données ($F_{5,42} = 1,18$, $p = 0,34$ pour les mâles, $F_{4,19} = 1,09$, $p = 0,39$ et $F_{4,67} = 1,91$, $p = 0,12$). Les concentrations sont donc aussi élevées au site de forte intensité agricole (Noire) qu'aux deux sites de faible intensité agricole (DS et LB). On peut même observer que les concentrations moyennes sont plus élevées à la rivière Noire qu'au site de Deborah Stairs, et ce, pour chacun des groupes (avec une différence plus marquée chez les femelles).

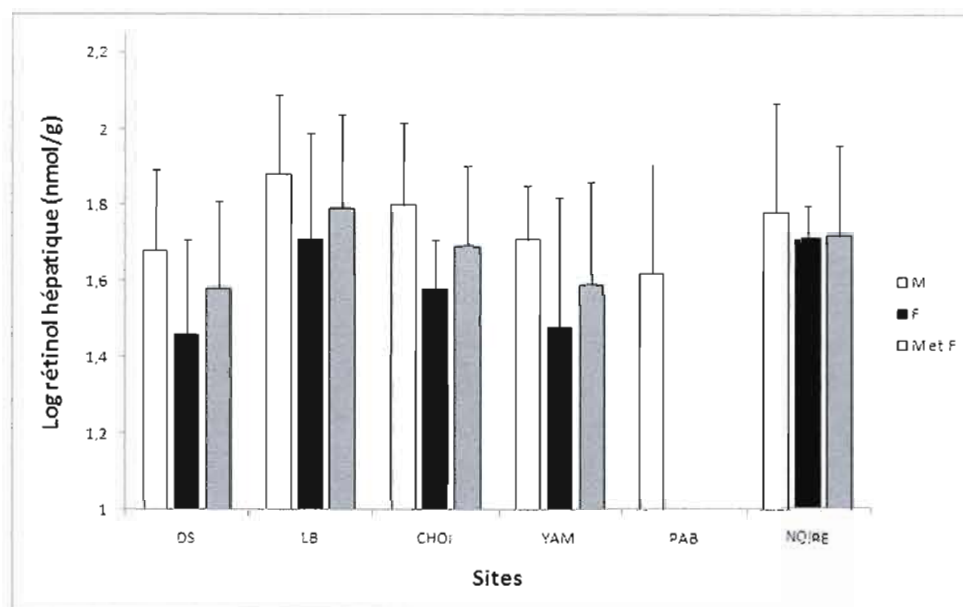


Figure 3.2 : Concentrations moyennes de rétinol hépatique pour les mâles et femelles échantillonnés en 2007. Les barres représentent la moyenne et l'écart type ($n = 3$ à 12).

Il importe ensuite de jeter un coup d'œil aux résultats obtenus pour les esters de rétinol totaux du foie (fig. 3.3). Les esters de rétinol étant la forme de stockage des rétinoïdes dans cet organe, leur concentration hépatique peut nous renseigner sur l'efficacité de leur mobilisation. Pour les mâles, la concentration moyenne des esters de rétinol hépatiques est significativement différente entre les sites ($F_{5,32} = 15,31$, $p < 0,0001$). En effet, elle est plus faible à la rivière Pot-au-Beurre qu'à tous les autres sites. En outre, les esters de rétinol sont aussi moins concentrés dans le foie des ouaouarons des rivières Noire et Yamaska si l'on compare aux ouaouarons du lac Boivin. De manière générale, chez les mâles, on remarque donc que les concentrations d'esters de rétinol sont plus élevées au site du lac Boivin. Chez les femelles, les seules différences significatives apparaissent entre les sites de la rivière Yamaska et du réservoir Choinière lorsqu'on les compare avec le lac Boivin où la concentration en esters de rétinol dans le foie est supérieure ($F_{4,16} = 4,95$, $p = 0,009$). Finalement, lorsque les mâles et les femelles sont jumelés, on ne remarque aucune différence significative.

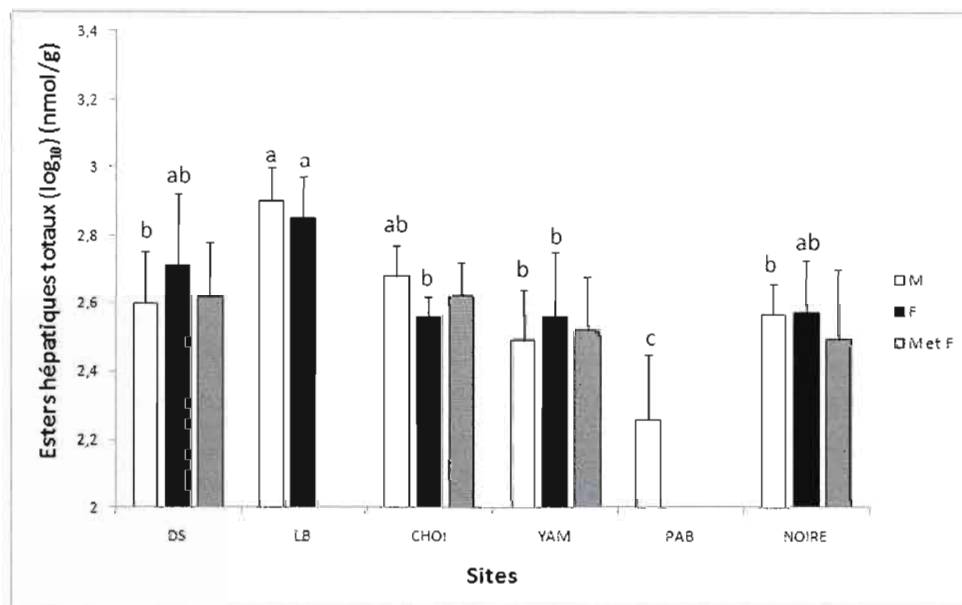


Figure 3.3 : Concentrations moyennes d'esters de rétinol hépatiques totaux pour les mâles et femelles échantillonnés en 2007. Les barres représentent la moyenne et l'écart type ($n = 3$ à 12). Les sites ayant au moins une lettre en commun ne sont pas statistiquement différents.

Afin de voir si une plus grande proportion des rétinoïdes hépatiques est sous une forme de stockage (esters de rétinol) ou sous une forme disponible pour le transport (rétinol), il est utile d'analyser le ratio des esters de rétinol sur le rétinol hépatique (fig. 3.4). Ainsi, en ce qui concerne les mâles, aucune différence significative n'est notée entre les sites ($F_{5,42} = 1,76$, $p = 0,15$). Chez les femelles, le même phénomène est observé ($F_{4,19} = 2,78$, $p = 0,07$). Cependant, une tendance semble indiquer que le ratio est plus faible à la rivière Noire chez les femelles. Cette situation refait surface lorsque l'on groupe les mâles et les femelles. À ce moment, la différence devient significative ($F_{4,67} = 2,60$, $p = 0,048$) avec un plus haut ratio au lac Boivin qu'à la rivière Noire.

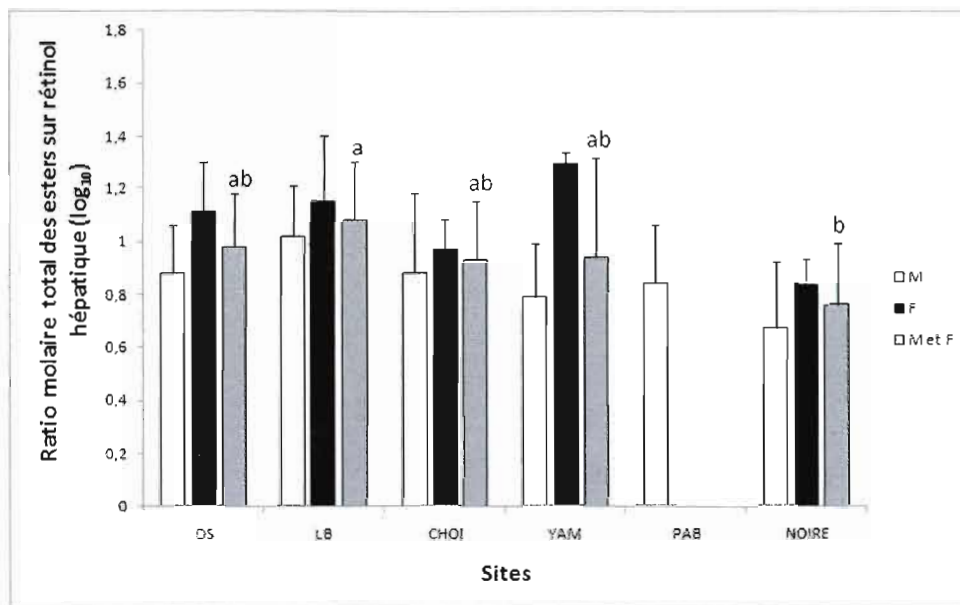


Figure 3.4 : Ratio esters de rétinol hépatiques totaux sur rétinol hépatique pour les mâles et femelles échantillonnés en 2007. Les barres représentent la moyenne et l'écart type ($n = 3$ à 12). Les sites ayant au moins une lettre en commun ne sont pas statistiquement différents.

Afin de comparer le rétinol en circulation dans le sang avec le rétinol présent dans le foie, les ratios de rétinol plasmatique sur le rétinol hépatique ont été calculés. Aucune différence significative n'a été détectée, que ce soit pour les mâles ($F_{5,42} = 1,94$, $p = 0,11$), pour les femelles ($F_{4,19} = 1,11$, $p = 0,38$) ou pour l'ensemble des données ($F_{4,67} = 2,42$, $p = 0,06$) comme on peut le voir à la figure 3.5. Une tendance est cependant remarquée pour l'ensemble des données. Le ratio semble ainsi plus faible au site du lac Boivin si on le compare par exemple au site de la rivière Yamaska. À la rivière Noire, ce ratio semble également assez faible par rapport aux autres sites.

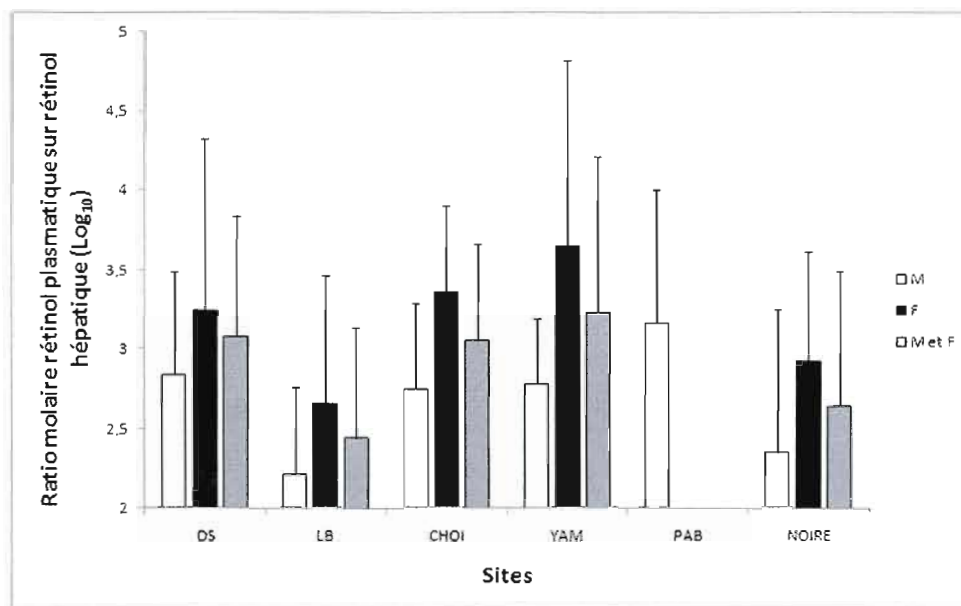


Figure 3.5 : Ratio rétinol plasmatique sur rétinol hépatique pour les mâles et femelles échantillonnés en 2007. Les barres représentent la moyenne et l'écart type (n = 3 à 12).

3.4 Résultats rétinoides 2008

Les résultats sont très intéressants pour l'année 2008 en ce qui concerne les concentrations de rétinol plasmatique (fig 3.6). En effet, pour les mâles, on remarque que les concentrations en rétinol aux deux sites de faible intensité agricole (Deborah Stairs et lac Boivin) sont significativement différentes de la concentration au site de rivière Noire où l'agriculture est intensive ($F_{5,111} = 2,99$, $p = 0,01$). Ainsi, les concentrations de rétinol dans le sang des ouaouarons de la rivière Noire sont plus faibles que dans le sang des ouaouarons provenant des sites de Deborah Stairs et du lac Boivin. Par contre, chez les femelles, la situation est différente puisqu'aucune différence significative n'a été dénotée entre les différents sites ($F_{4,16} = 1,04$, $p = 0,42$). Finalement, lorsque l'on regroupe les mâles et les femelles, on observe sensiblement le même patron que chez les mâles. Les concentrations sont significativement plus élevées chez les grenouilles de Deborah Stairs si on les compare avec les individus provenant de la rivière Noire ($F_{3,83} = 3,71$, $p = 0,0148$).

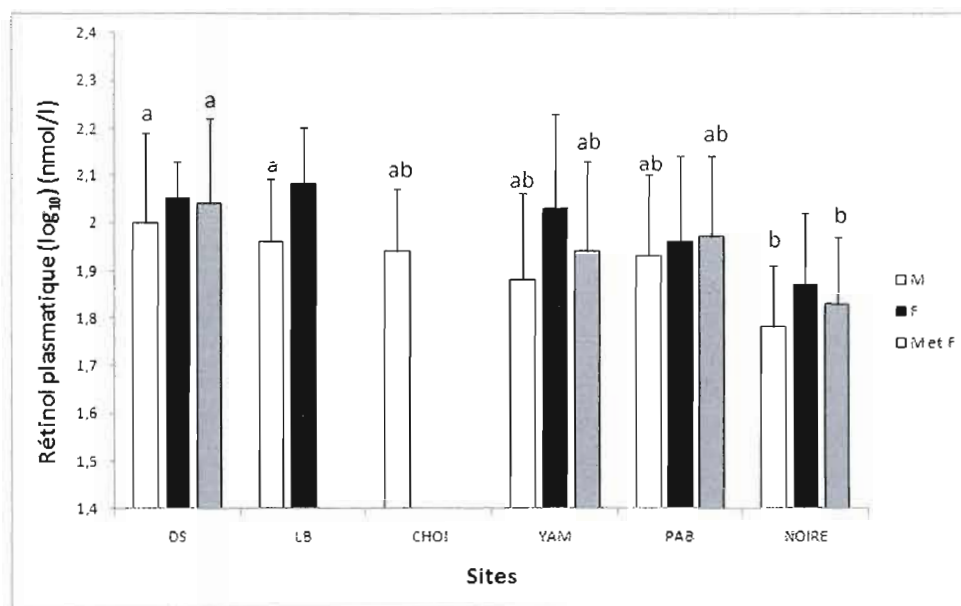


Figure 3.6 : Concentrations moyennes de rétinol plasmatique pour les mâles et femelles échantillonnés en 2008. Les barres représentent la moyenne et l'écart type (n = 2 à 30). Les sites ayant au moins une lettre en commun ne sont pas statistiquement différents.

Lorsqu'on regarde les résultats pour le rétinol hépatique, on remarque immédiatement que les concentrations à la rivière Noire et à la rivière Pot-au-Beurre sont plus faibles qu'aux autres sites (fig 3.7). La différence est significative entre ces sites et le lac Boivin pour les mâles seulement ($F_{5,46} = 3,57$, $p = 0,009$) et pour le groupe combinant les mâles et les femelles ($F_{4,67} = 4,03$, $p = 0,0004$). Malgré le fait qu'aucune différence significative n'est relevée pour les femelles ($F_{4,15} = 1,91$, $p = 0,16$), on observe un patron similaire puisque les concentrations de rétinol hépatique sont aussi les plus faibles à la rivière Noire et à la rivière Pot-au-Beurre.

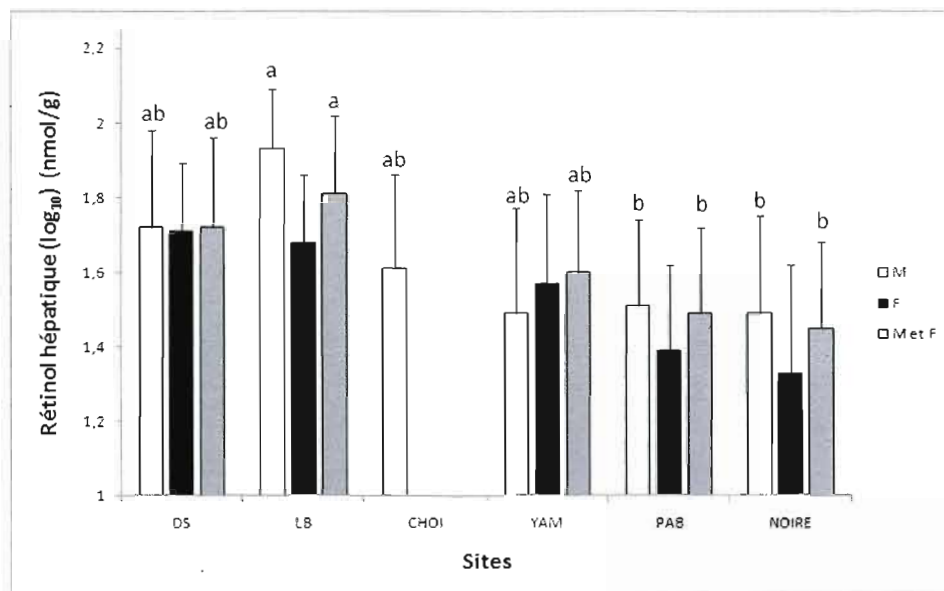


Figure 3.7 : Concentrations moyennes de rétinol hépatique pour les mâles et femelles échantillonnés en 2008. Les barres représentent la moyenne et l'écart type ($n = 2$ à 12). Les sites ayant au moins une lettre en commun ne sont pas statistiquement différents.

La concentration totale des esters de rétinol hépatiques a aussi été analysée pour les ouaouarons échantillonnés en 2008 (fig 3.8). Ainsi, plusieurs différences significatives ressortent de ces analyses. Chez les mâles, les concentrations hépatiques d'esters de rétinol sont plus élevées au site du lac Boivin qu'à la rivière Pot-au-Beurre ($F_{5,46} = 2,53$, $p = 0,04$). Chez les femelles, les niveaux au lac Boivin sont plus élevés que ceux à la rivière Yamaska, à la rivière Noire et à la rivière Pot-au-Beurre ($F_{4,15} = 6,43$, $p = 0,003$). Finalement, si on groupe les données ensemble, on obtient encore une fois une différence entre le site du lac Boivin et les sites de la rivière Yamaska, de la rivière Noire et de la rivière Pot-au-Beurre ($F_{4,67} = 7,60$, $p < 0,0001$). Si on regarde le portrait d'ensemble, on remarque que le site de faible intensité agricole du lac Boivin présente une concentration en esters de rétinol qui est plus élevée qu'aux sites de faible et moyenne intensité agricole.

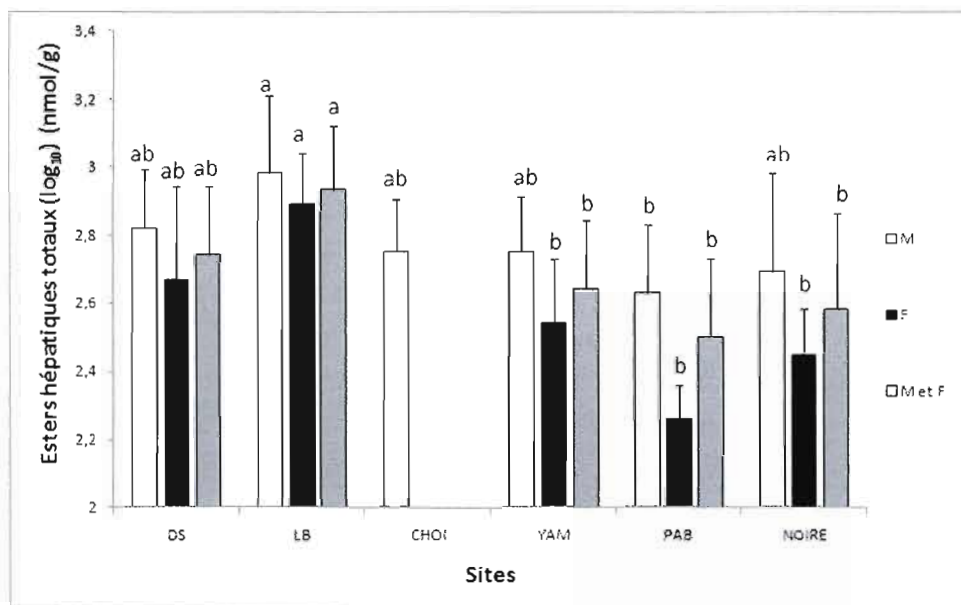


Figure 3.8 : Concentrations moyennes d'esters de rétinol hépatiques totaux pour les mâles et femelles échantillonnés en 2008. Les barres représentent la moyenne et l'écart type ($n = 2$ à 12). Les sites ayant au moins une lettre en commun ne sont pas statistiquement différents.

Si on analyse le ratio des esters de rétinol totaux sur le rétinol hépatique pour les ouaouarons capturés en 2008, on remarque qu'il n'y a aucune différence significative entre les sites pour les mâles, ($F_{5,46} = 0,26$, $p = 0,93$), pour les femelles ($F_{4,15} = 1,06$, $p = 0,41$) et pour l'ensemble des données ($F_{4,67} = 2,17$, $p = 0,08$). On dénote par contre une tendance lorsque les mâles et les femelles sont groupés puisque $p < 0,1$. Ainsi, le ratio semble un peu plus élevé aux sites de la rivière Noire et du lac Boivin (fig. 3.9).

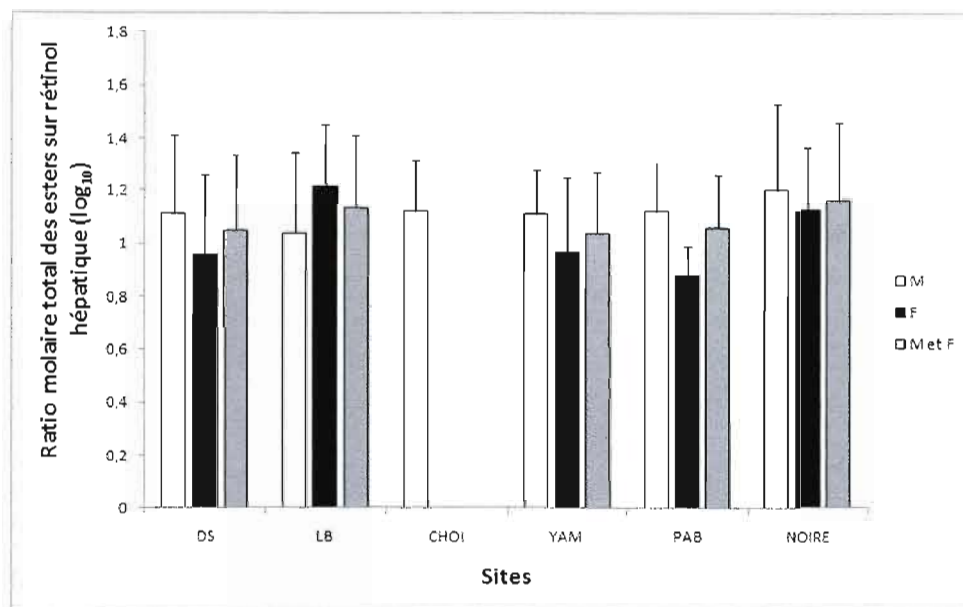


Figure 3.9 : Ratio esters de rétinol hépatiques totaux sur rétinol hépatique pour les mâles et femelles échantillonnés en 2008. Les barres représentent la moyenne et l'écart type (n = 2 à 12).

Finalement, le ratio de la concentration de rétinol plasmatique sur la concentration de rétinol hépatique a été analysé pour les individus échantillonnés en 2008 (fig. 3.10). La seule différence significative qui ressort de cette analyse est celle que l'on peut observer entre les mâles de la rivière Pot-au-Beurre et les mâles du lac Boivin ($F_{5,46} = 1,95$, $p = 0,10$). Cette différence n'apparaît pas avec les femelles seulement ($F_{4,15} = 0,27$, $p = 0,89$) ni avec les mâles et les femelles regroupés ($F_{4,67} = 0,79$, $p = 0,51$).

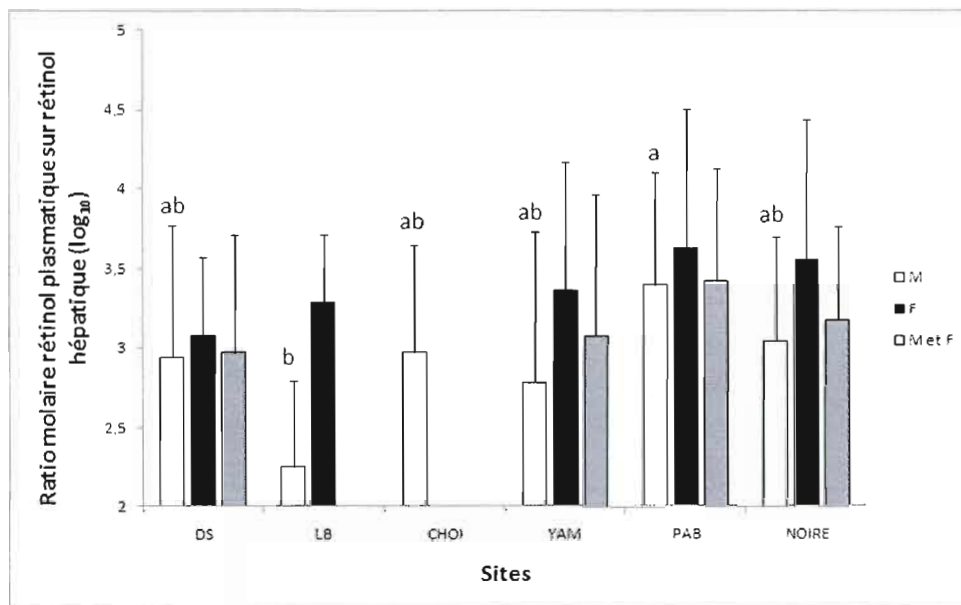


Figure 3.10 : Ratio rétinol plasmatique sur rétinol hépatique pour les mâles et femelles échantillonnés en 2008. Les barres représentent la moyenne et l'écart type ($n = 2$ à 12). Les sites ayant au moins une lettre en commun ne sont pas statistiquement différents.

3.5 Résultats pour la longueur museau-cloaque (LMC)

En ce qui concerne la LMC, une différence significative a été détectée entre les sites pour les mâles de 2007 et de 2008 ($p < 0,0001$ et $p = 0,0048$ respectivement) alors qu'aucune différence n'a été relevée chez les femelles (Tab. 3.3). Les résultats d'un test de Dunnett montrent une différence entre les ouaouarons de la rivière Pot-au-Beurre et les ouaouarons de tous les autres sites. Les mâles de la rivière Pot-au-Beurre présentent la LMC la plus grande pour l'année 2007 ($14 \pm 1,7$) alors que la plus petite LMC pour les mâles est retrouvée à Deborah Stairs ($11,4 \pm 1,7$). En 2008, la situation est un peu différente puisque la LMC la plus élevée se situe chez les mâles du Lac Boivin ($13,1 \pm 1,0$) alors que la plus petite est détectée à la rivière Yamaska ($11,7 \pm 1,6$). Des différences significatives sont détectées entre les grenouilles du Lac Boivin et ceux du réservoir Choinière ($p = 0,0103$) et de la rivière

Yamaska ($p = 0,0014$). En outre, une différence est notée entre les ouaouarons de la rivière Pot-au-Beurre et ceux de la rivière Yamaska ($p = 0,0269$).

Tableau 3.3 : Longueur museau-cloaque (LMC) en fonction des sites.

			Deborah Stairs	Lac Boivin	Réservoir Choinière	Rivière Yamaska	Rivière Pot-au- Beurre	Rivière Noire	Différence entre sites (p)
LMC (cm)	2007	m	11,4 $\pm 2,9$	12,0 $\pm 1,0$	12,5 $\pm 1,3$	11,9 $\pm 0,4$	14 $\pm 1,7$	11,6 $\pm 1,3$	< 0,0001 0,60
		f	11,3 $\pm 2,0$	12,1 $\pm 1,7$	11,9 $\pm 1,6$	12,8 $\pm 1,4$	ND	11,5 $\pm 2,3$	
LMC (cm)	2008	m	12,4 $\pm 1,0$	13,1 $\pm 1,0$	11,9 $\pm 0,9$	11,7 $\pm 1,6$	12,7 $\pm 1,0$	12,1 $\pm 1,9$	0,0048 0,60
		f	12,8 $\pm 1,5$	13,9 $\pm 0,5$	ND	13,3 $\pm 1,6$	13,0 ± 0	12,3 $\pm 2,9$	

3.6 Résultats ratio poids du foie sur LMC

Lorsque l'on compare le ratio poids du foie sur LMC à chacun des sites (fig. 3.11), on observe qu'une différence significative entre les sites est seulement présente chez les mâles. En effet, le ratio est plus élevé à la rivière Pot-au-Beurre qu'à tous les autres sites ($F_{5,42} = 6,37, p = 0,0002$).

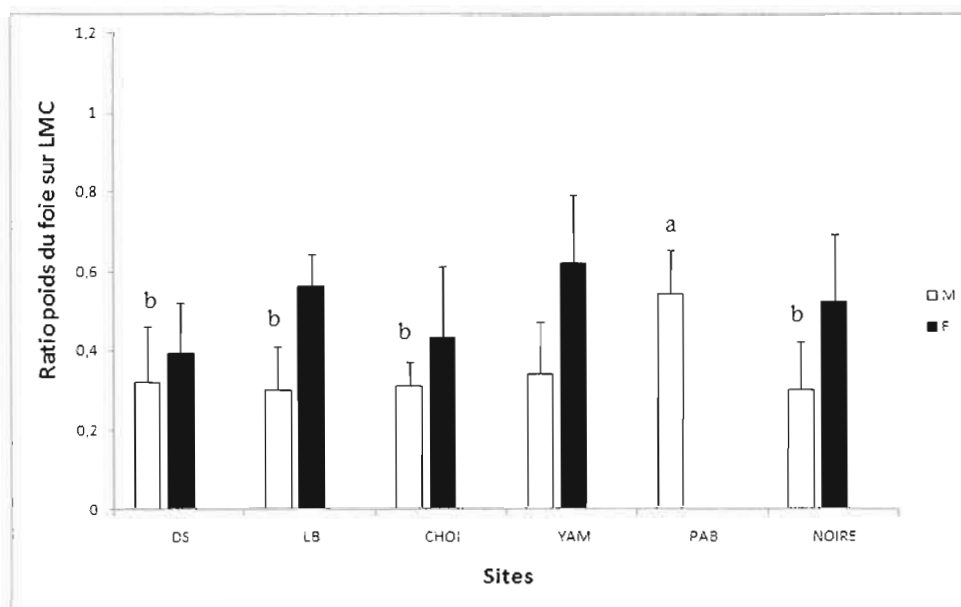


Figure 3.11 : Ratio poids du foie sur la longueur museau-cloaque (LMC) pour les mâles et femelles échantillonnés en 2007. Les barres représentent la moyenne et l'écart type ($n = 3$ à 11). Les sites ayant au moins une lettre en commun ne sont pas statistiquement différents.

La comparaison du ratio du poids du foie sur la longueur museau-cloaque pour 2008 (fig. 3.12) permet de constater une différence significative entre les sites pour les femelles seulement (F ratio = 5,07, $p = 0,01$). Ainsi, le ratio est plus élevé aux sites de la rivière Noire et la rivière Pot-au-Beurre si on compare avec le site de Deborah Stairs.

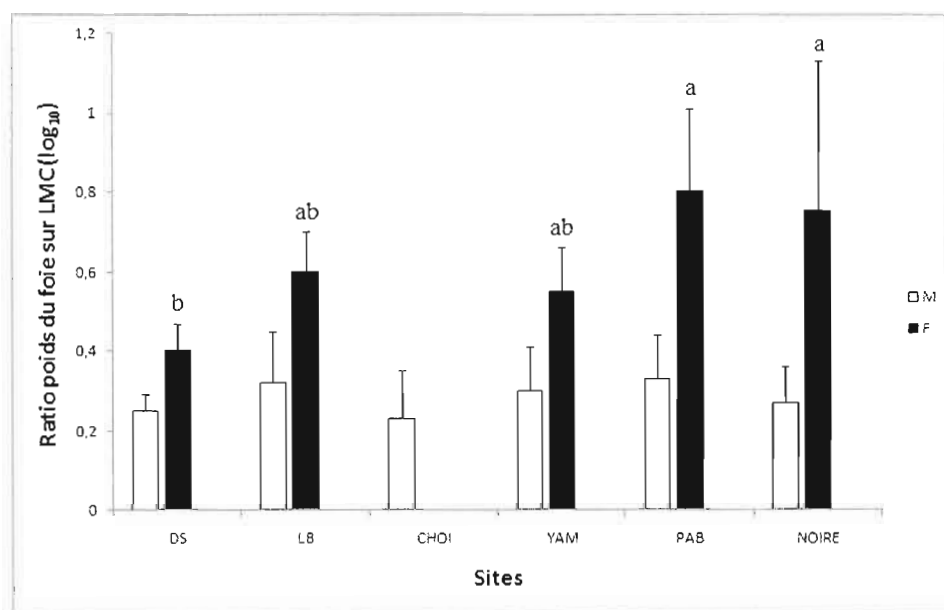


Figure 3.12 : Ratio poids du foie sur la longueur museau-cloaque (LMC) pour les mâles et femelles échantillonnés en 2008. Les barres représentent la moyenne et l'écart type ($n = 2$ à 12). Les sites ayant au moins une lettre en commun ne sont pas statistiquement différents.

3.7 Résultats préliminaires du dosage de la RBP, de la TTR, du complexe Rétinol-RBP et du complexe Rétinol-RBP-TTR dans le plasma

Suite à l'observation d'une baisse du rétinol plasmatique et puisque le rétinol hépatique ne semble pas influencé au site de forte intensité agricole, nous avons émis comme hypothèse que le transport du rétinol dans le plasma pouvait être affecté par les polluants d'origine agricole. Ainsi, quatre hypothèses ont été mises de l'avant afin d'expliquer un problème de transport du rétinol dans le plasma. La première fait

intervenir une baisse de la synthèse de la RBP et/ou de la TTR dans le foie des ouaouarons alors que dans la seconde, nous avons supposé que la synthèse de ces protéines n'est pas affectée par la contamination agricole, mais que la mobilisation de ces protéines à partir de leur site de synthèse, dans le foie, vers le plasma pourrait être altérée. En troisième lieu, nous pouvons supposer qu'un problème d'interaction entre la RBP et la TTR pourrait expliquer une baisse du rétinol dans le plasma des grenouilles. En effet, en temps normal, la RBP, suite à sa liaison avec le rétinol, se combine à la TTR afin de former un volumineux complexe d'environ 80 kDa qui n'est pas filtré par les glomérules et qui peut donc rester dans la circulation sanguine. Par contre, si la liaison entre la RBP et la TTR ne se fait pas pour une raison ou une autre, le complexe RBP/rétinol de seulement 20 kDa sera directement filtré par les reins et éliminé dans l'urine, d'où une baisse des concentrations plasmatiques de rétinol. Finalement, en dernier lieu, il est possible que les contaminants d'origine agricole affectent le métabolisme du rétinol en augmentant sa dégradation dans le plasma.

Dans cette section, nous nous sommes affairés à vérifier la troisième hypothèse, c'est-à-dire celle dans laquelle on soupçonne qu'un problème de liaison entre la RBP et la TTR soit à l'origine d'une baisse de rétinol plasmatique au site de forte intensité agricole. Il est donc intéressant de quantifier les niveaux plasmatiques de RBP. En outre, le fait de quantifier la RBP seule, la TTR seule, la RBP liée au rétinol seulement et le complexe rétinol-RBP-TTR nous permettrait d'avoir une idée de la dynamique du transport de la RBP. Bien que cette quantification était envisageable en raison des différents poids moléculaires et de l'absorption maximale différente des protéines liées au rétinol (280 nm et 330 nm) et des protéines sans rétinol (280 nm seulement), il a été impossible, en pratique, de réaliser celle-ci en chromatographie à haute performance en exclusion de taille. Nous présentons quand même ici le bilan des expériences qui ont été réalisées concernant ce volet de l'étude.

Nous avons d'abord injecté un standard de protéines de différents poids moléculaires afin de voir les temps de rétention des protéines en fonction de leur taille. Ainsi, le tamis de poids moléculaire comprenait la thyroglobuline à 5 mg/ml (670 kDa), la gamma globuline à 5 mg/ml (158 kDa), l'ovalbumine à 5 mg/ml (44 kDa), la myoglobine à 2,5 mg/ml (17 kDa) et la vitamine B12 à 0,5 mg/ml (1,35 kDa). La solution de tamis a été diluée 50 fois avant l'injection. Nous avons donc injecté ces protéines avec la phase mobile utilisée par Burri et Kutnink (1989). Le chromatogramme obtenu est présenté à la figure 3.13. Les résultats semblaient alors encourageants puisque des pics étaient observés pour chacune des protéines. Il importe de mentionner que les plus petites protéines sont retenues plus longtemps par la colonne et que les protéines de masse plus importante apparaissent donc en premier dans le chromatogramme. On observe que les quatre protéines les plus grosses sortent très bien sur le graphique, alors qu'il semble y avoir un double pic pour la vitamine B12. De plus, un creux où l'absorbance est négative apparaît un peu plus loin dans le graphique.

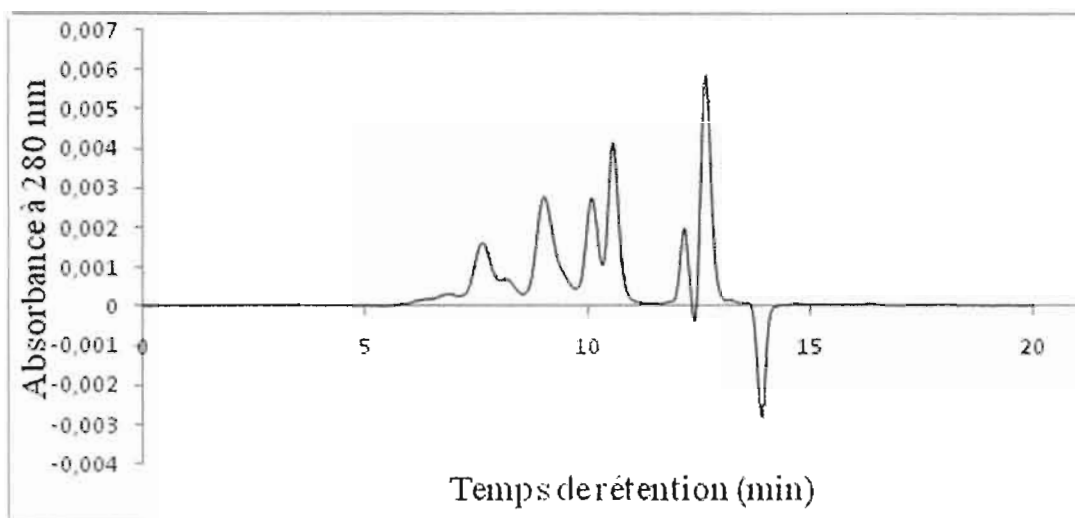


Fig 3.13 : Chromatogramme du tamis de poids moléculaires (dilué 1/50). La vitesse d'élution de la phase mobile est de 0,5 ml/min. Un volume de 50 μ l a été injecté dans une boucle d'injection de 100 μ l.

Nous avons donc essayé d'optimiser la méthode en jouant avec la vitesse d'élution. Nous avons injecté le tamis avec deux nouvelles vitesses d'élution, c'est-à-dire, 1,5 ml/min (fig 3.14) et 0,3 ml/min (fig 3.15). À une vitesse d'élution de 1,5 ml/min, les protéines sortent plus rapidement de la colonne, mais les pics obtenus sont plus condensés, ce qui pourrait nuire à la quantification. En outre, le double pic semble toujours apparaître pour la vitamine B12. À une vitesse d'élution de 0,3 ml/min, tout comme à 0,5 ml/min, on observe une bonne séparation des pics, cependant le problème du dernier pic demeure. Nous avons décidé de poursuivre les expériences avec la vitesse d'élution de 0,5 ml/min puisqu'elle permet de bien séparer les protéines de taille différente. Cependant, nous avons essayé de changer la boucle d'injection afin d'injecter de plus petits volumes dans le système. Cette tentative n'a apportée aucun changement quant à la qualité des chromatogrammes obtenus et nous avons donc décidé d'injecter dans une boucle de 20 μ l pour les expériences subséquentes.

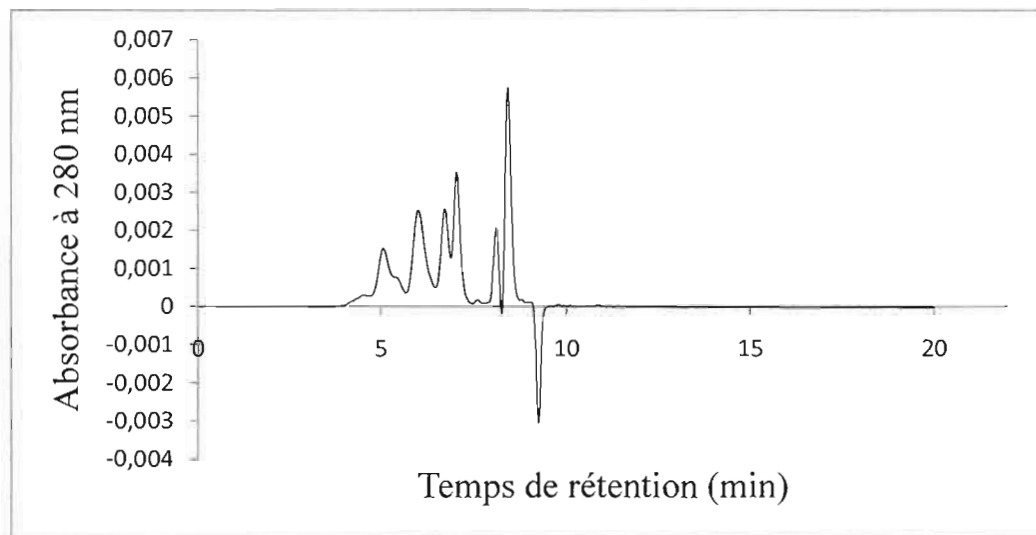


Fig 3.14 : Chromatogramme du tamis de poids moléculaires (dilué 1/50). La vitesse d'élution de la phase mobile est de 1,5 ml/min. Un volume de 50 μ l a été injecté dans une boucle d'injection de 100 μ l.

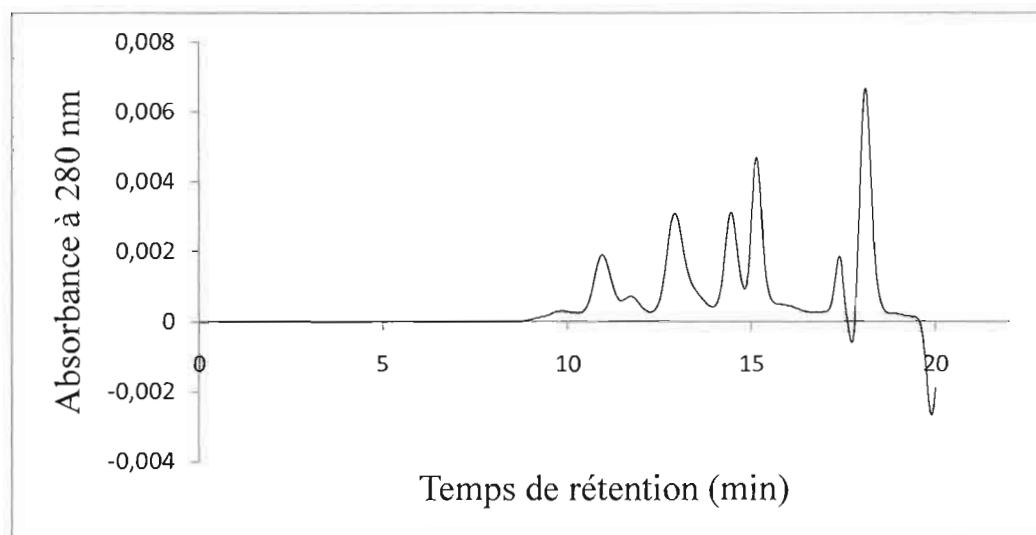


Fig 3.15 : Chromatogramme du tamis de poids moléculaires (dilué 1/50). La vitesse d'élution de la phase mobile est de 0,3 ml/min. Un volume de 50 μ l a été injecté dans une boucle d'injection de 100 μ l.

Nous avons alors essayé de diluer notre tamis de poids moléculaire 250 fois pour voir si le chromatogramme était mieux défini. Nous avons conservé une vitesse d'élution de 0,5 ml/min et injecté un peu plus de 20 μ l de la solution provenant du tamis dans une boucle de 20 μ l. Le chromatogramme de cette injection est présenté à la figure 3.16. Pour une raison qui demeure inconnue, les pics obtenus ont tous été décalés vers la droite par rapport aux analyses précédentes à une vitesse d'élution de 0,5 ml/min. Les pics ont toujours sorti à ces temps à partir de ce moment et ce jusqu'à la fin des expérimentations. Cette fois, le pic de la vitamine B12, à environ 26 minutes, apparaît mieux défini. Cependant, deux creux d'absorbance négative apparaissent. Ils pourraient être causés par une substance présente dans la phase mobile qui absorbe de façon négative à cette longueur d'onde. Nous avons donc décidé de modifier quelque peu la méthode en changeant la phase mobile.

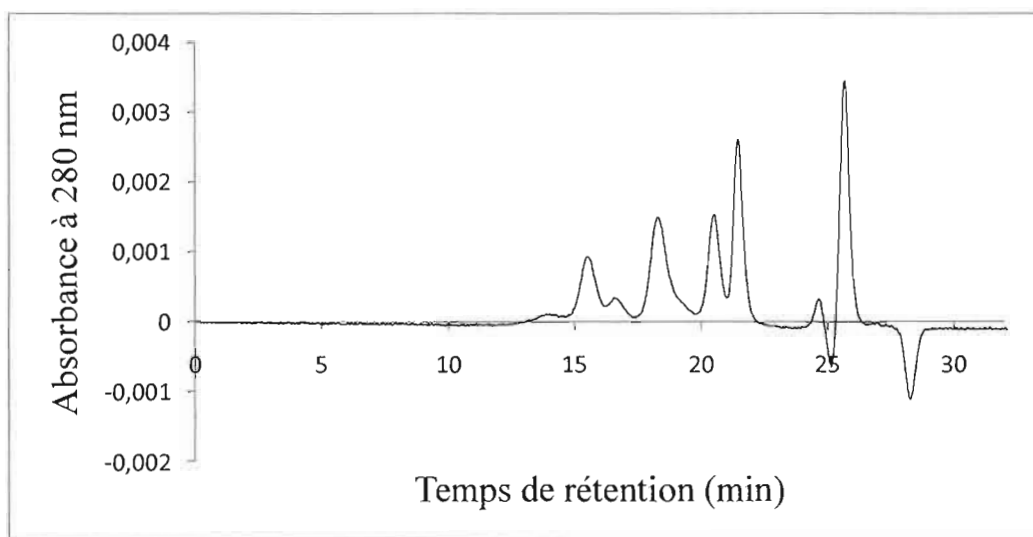


Fig 3.16 : Chromatogramme du tamis de poids moléculaires (dilué 1/50). La vitesse d'élution de la phase mobile est de 0,5 ml/min. Un volume d'un peu plus de 20 μ l a été injecté dans une boucle d'injection de 20 μ l.

Tout d'abord, nous avons tenté une injection du standard de protéines avec une phase mobile constituée seulement de saline isotonique (150 mmol/l de NaCl) dans laquelle était dilué notre échantillon de départ. Le chromatogramme obtenu avec la saline isotonique en tant que phase mobile présente encore une fois des creux où l'absorbance est négative.

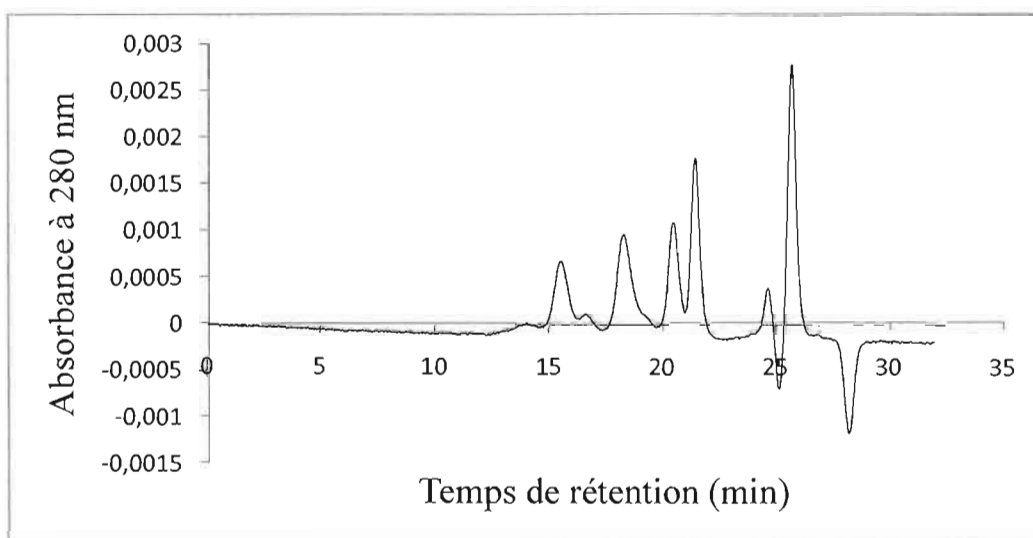


Fig 3.17 : Chromatogramme du tamis de poids moléculaires (dilué 1/250). La vitesse d'élution de la phase mobile est de 0,5 ml/min. Un volume d'un peu plus de 20 μ l a été injecté dans une boucle d'injection de 20 μ l.

À ce moment, nous avons essayé une nouvelle phase mobile suggérée par Johanne Paquin du département de chimie de l'UQAM : 0,1 M Na_2SO_4 , 0,1 M KH_2PO_4 et 0,05 % d'azoture de sodium dont le pH était maintenu à 6 avec du NaOH. Les résultats obtenus avec cette méthode furent excellents. En effet, les creux où l'absorbance est négative ont disparu et les pics des cinq protéines contenues dans le tamis étaient très bien définis (fig. 3.18). En outre, la méthode était reproductible et les protéines présentaient toujours le même temps de rétention. Nous avons donc choisi de poursuivre avec cette méthode pour la suite des expérimentations.

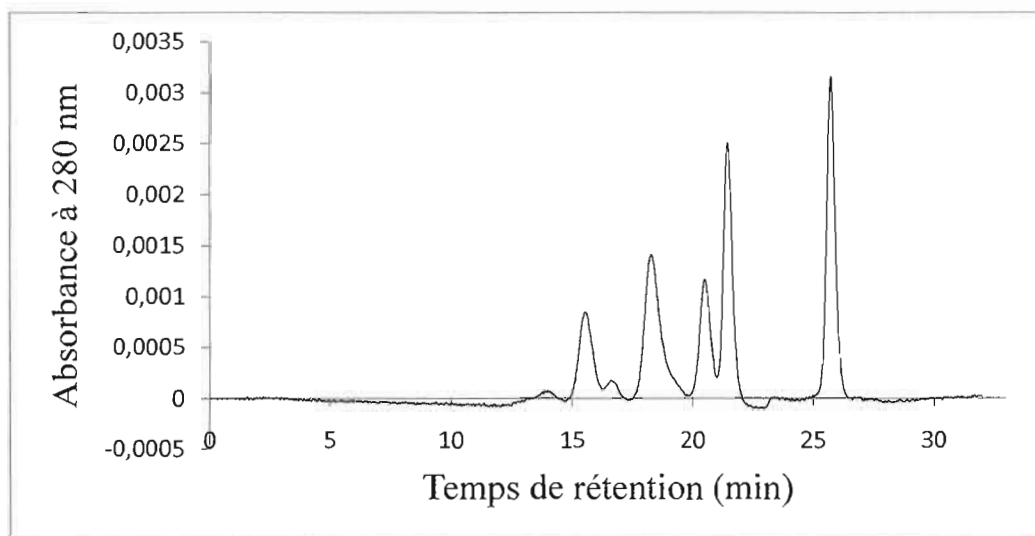


Fig 3.18 : Chromatogramme du tamis de poids moléculaires (dilué 1/250). La vitesse d'élution de la phase mobile est de 0,5 ml/min. Un volume d'un peu plus de 20 μ l a été injecté dans une boucle d'injection de 20 μ l.

Puisque la méthode semblait très reproductible, nous avons réalisé une courbe standard mettant en relation le log du poids moléculaire en fonction du temps de rétention. Nous avons ainsi obtenu une régression linéaire avec un coefficient de 0,996 (fig 3.19). C'est donc dire que la méthode fonctionne très bien afin de séparer des protéines de poids moléculaires différents. Selon cette courbe de régression, il est possible de déterminer que le complexe rétinol-RBP-TTR d'environ 80 kDa aura un temps de rétention de 19,2 minutes et que la TTR libre dont le poids moléculaire est de 54 kDa aura un temps de rétention de 19,8 minutes. La RBP libre qui possède un poids moléculaire de 21 kDa devrait pour sa part sortir de la colonne après 21,4 minutes. Il devrait également être possible de détecter les concentrations de holo-RBP et de RBP libre. En effet, à une absorbance de 330 nm, on devrait détecter seulement la RBP liée au rétinol puisque ce dernier absorbe à cette longueur d'onde. Puis, à une absorbance de 280 nm, on devrait détecter les concentrations de RBP totale puisqu'il s'agit de la longueur d'onde d'absorption de la protéine. En faisant la différence entre la concentration de RBP totale et la concentration de holo-RBP, il est possible de

déterminer les concentrations d'apo-RBP. Il faut noter que la masse du rétinol est si petite par rapport à celle de la RBP que la liaison de ce dernier à la RBP ne change pas le temps de rétention.

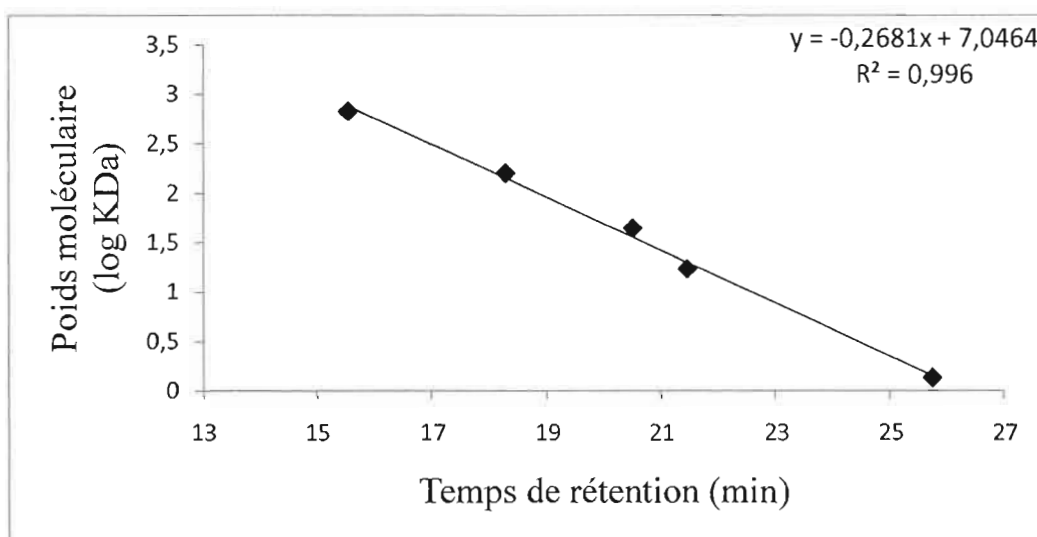


Fig 3.19 : Régression linéaire entre le poids moléculaire des protéines comprises dans le tamis et leur temps de rétention dans la colonne du HPLC. Thyroglobuline à 5 mg/ml (PM = 670 kDa; 15,5 mins), Gamma globuline à 5 mg/ml (PM = 158 kDa; 18,3 mins), Ovalbumine à 5 mg/ml (PM = 44 kDa; 20,5 mins), Myoglobine à 2,5 mg/ml (PM = 17 kDa; 21,5 mins), Vitamine B12 à 0,5 mg/ml (PM = 1,35 kDa; 25,7 mins). Le tamis a été dilué 250 fois avant chaque injection. Les temps de rétention représentent la moyenne de trois injections différentes.

Nous avons ensuite injecté un standard de RBP afin de voir s'il était bien possible de détecter cette protéine par notre méthode de HPLC en exclusion de masse. Nous avons donc injecté 20 µl d'une solution contenant 40 µg/l de RBP. Cette concentration a été utilisée car la concentration moyenne de cette protéine dans le sang humain est légèrement supérieure à 40 µg/l (Smith et Goodman, 1971). Il fut impossible de trouver les concentrations pour le ouaouaron ainsi que pour les amphibiens dans la littérature, nous avons donc décidé de travailler avec les concentrations retrouvées chez l'humain. Ainsi, le chromatogramme présenté à la figure 3.20 montre bien un pic à environ 21 minutes. Par contre, un pic inconnu

apparaît aussi un peu plus tard. Il fut malheureusement impossible d'éliminer ce pic malgré plusieurs injections du standard de RBP. Il est possible que le standard de RBP qui a été utilisé ne soit pas pur à 100 %. Par exemple, il est possible que les deux pics représentent deux sous-unités de la protéine recherchée.

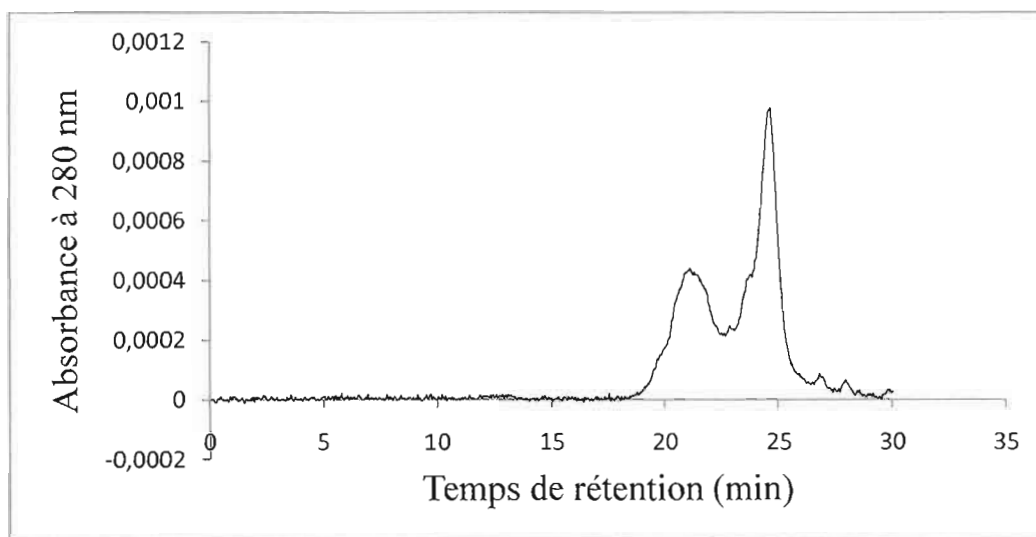


Fig 3.20 : Chromatogramme du standard de RBP à 40 µg/l. La vitesse d'élution de la phase mobile est de 0,5 ml/min. Un volume d'un peu plus de 20 µl a été injecté dans une boucle d'injection de 20 µl.

À la figure 3.21, on peut observer un chromatogramme obtenu suite à l'injection d'un standard de plasma humain non filtré et non dilué. On observe un ensemble de pics entre 17 et 21 minutes environ. Par contre, il est impossible d'isoler clairement les protéines de transport sur ce graphique.

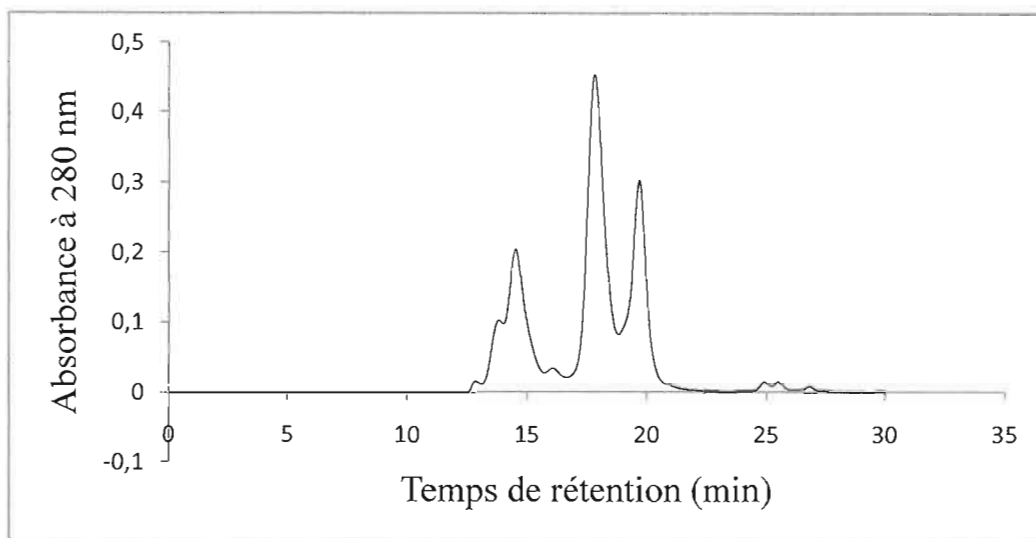


Fig 3.21 : Chromatogramme d'un standard de plasma humain non dilué et non filtré. La vitesse d'élution de la phase mobile est de 0,5 ml/min. Un volume d'un peu plus de 20 μ l a été injecté dans une boucle d'injection de 20 μ l.

Malgré ces résultats peu concluants avec le plasma humain, nous avons quand même injecté le plasma de ouaouaron. Ainsi, il est possible de remarquer, à la figure 3.22, que les résultats sont sensiblement identiques que lorsque l'on utilise le plasma humain.

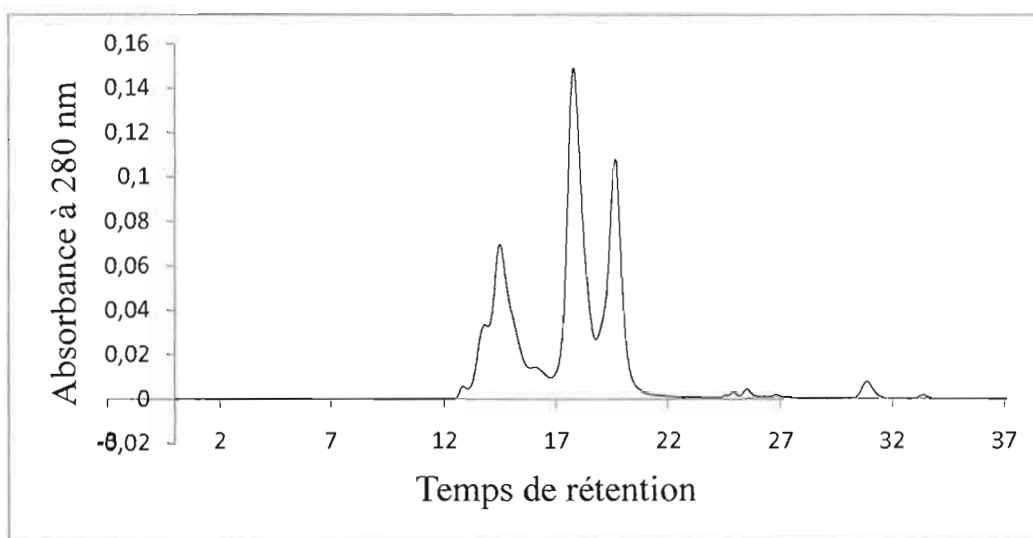


Fig 3.22 : Chromatogramme de l'échantillon de plasma d'un ouaouaron provenant de l'échantillonnage de 2008 au Lac Boivin. La vitesse d'élution de la phase mobile est de 0,5 ml/min. Un volume d'un peu plus de 20 μ l a été injecté dans une boucle d'injection de 20 μ l.

Nous pouvons aussi voir que le chromatogramme représentant l'absorbance à 330 nm possède sensiblement la même allure à l'exception qu'on y retrouve un pic à environ 31 minutes (fig 3.23) Puisque le rétinol est une molécule beaucoup plus petite (0,286 kDa) que les protéines de transport et que son absorbance maximale est de 330 nm, on soupçonne que ce pic soit en fait le rétinol du plasma. Le rétinol devrait en effet présenter un temps de rétention d'environ 28,3 minutes. Il fut cependant impossible de détecter le rétinol seul lors d'injection de standards de cette molécule.

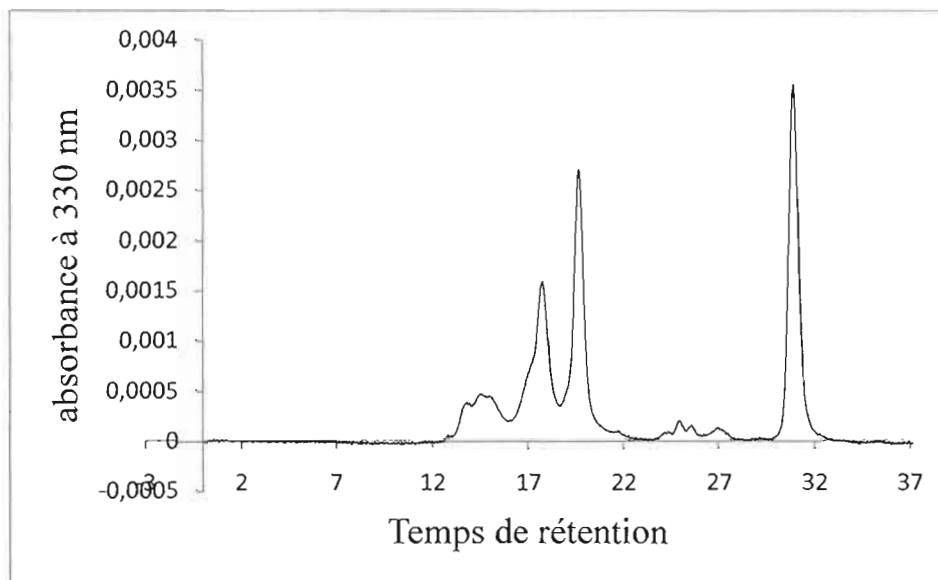


Fig 3.23 : Chromatogramme de l'échantillon de plasma d'un ouaouaron provenant de l'échantillonnage de 2008 au Lac Boivin. La vitesse d'élution de la phase mobile est de 0,5 ml/min. Un volume d'un peu plus de 20 μ l a été injecté dans une boucle d'injection de 20 μ l.

Nous avons ensuite décidé de procéder à un autre essai. Nous avons donc incubé la RBP seule, la RBP et du rétinol et la RBP, du rétinol et du plasma pendant une nuit à 4 °C avant l'injection (Van Bennekum *et al.*, 1993). De cette façon, en mesurant l'absorbance à 280 nm et à 330 nm, il devrait être possible de détecter la holo-RBP (280 nm et 330 nm) et la apo-RBP (280 nm). En incubant avec le plasma, nous voulions voir si un nouveau pic apparaissait ou s'il était camouflé par les autres pics. Les résultats obtenus suite à cette incubation ne furent pas concluants. En effet, les résultats ne furent pas différents de ceux obtenus avec le standard de RBP ou avec le plasma.

Comme mentionné dans le chapitre II, nous avons ensuite récolté des fractions à les 30 secondes (250 μ l) et réinjectées celles-ci afin de séparer le plus possible les

protéines de notre échantillon et ainsi se donner toutes les chances de détecter les deux protéines recherchées. Cette tentative s'est encore une fois avérée vaine.

Comme les IgG sont des protéines de poids moléculaire semblable au complexe rétinol-RBP-TTR et qui sont abondantes dans la circulation sanguine, il se pourrait que ces dernières soient principalement responsables du fait que l'on ne puisse pas détecter les protéines que l'on recherche. En effet, les IgG devraient posséder un temps de rétention de 18,2 minutes sous forme de dimères (150 kDa) et de 20,8 minutes sous forme de monomères (75 kDa). Comme on peut le voir sur le graphique de la figure 3.24, le pic obtenu suite à l'injection d'un standard d'IgG se trouve en fait exactement dans la fenêtre de temps où on pourrait voir apparaître le complexe rétinol-RBP-TTR. Par ailleurs, on sait que l'albumine dont le poids moléculaire se situe autour de 70 kDa pourrait aussi interférer avec la détection de nos deux protéines de transport.

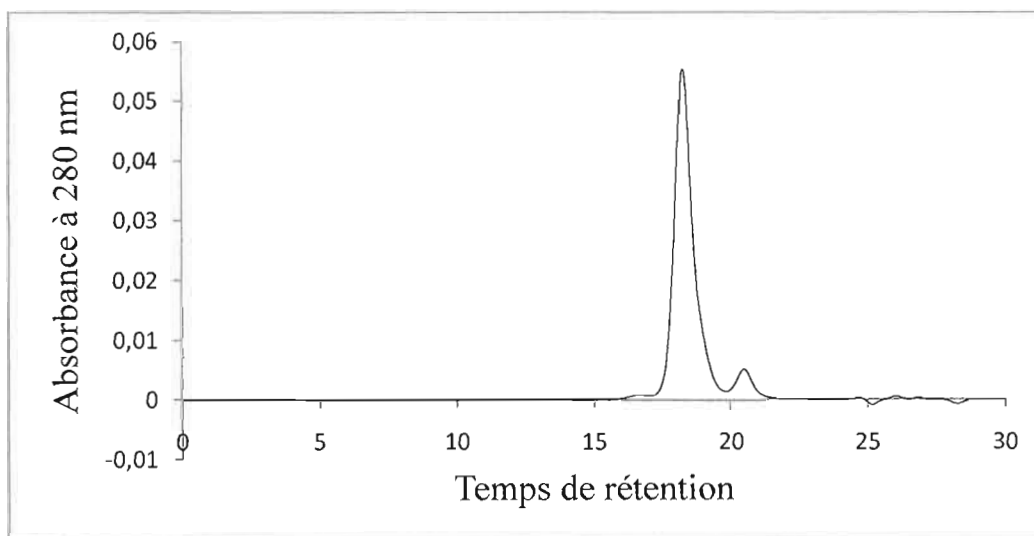


Fig 3.24 : Chromatogramme du standard d'IgG. La vitesse d'élution de la phase mobile est de 0,5 ml/min. Un volume d'un peu plus de 20 μ l a été injecté dans une boucle d'injection de 20 μ l.

3.8 Résultats préliminaires des analyses de RT-PCR effectuées dans le but de vérifier les taux de synthèse hépatique pour la RBP et la TTR

Puisqu'il a été impossible de doser les protéines de transport dans le plasma, nous nous sommes tournés vers une autre étape du projet qui prévoyait que l'on évalue le taux de synthèse hépatique de ces protéines en quantifiant l'ARNm de celles-ci au niveau du foie. En effet, il est possible que la baisse de rétinol plasmatique chez les ouaouarons provenant de la rivière Noire soit causée par une altération des ou de l'une des protéines de transport plutôt que par un problème d'interaction entre les deux molécules. Ainsi, dans cette section, les résultats préliminaires concernant la première hypothèse que nous avons émise dans la section précédente, c'est-à-dire un impact des contaminants agricoles sur la synthèse des protéines de transport du rétinol, sont présentés.

Tout d'abord, nous avons procédé à l'extraction de l'ARN total du foie d'un ouaouaron femelle provenant du site du Lac Boivin et échantillonné en 2008. On peut observer le résultat de cette extraction ci-dessous sur la figure 3.25. En fait, il ne semble pas y avoir trop de dégradation de l'ARN puisque l'on n'observe pas une longue traînée sur l'ensemble du gel. L'ARN semble concentré dans la partie inférieure du gel. Néanmoins, lorsque l'on procède à une telle extraction avec des cellules eucaryotes, on observe habituellement deux bandes bien distinctes qui sont en fait l'ARN des sous-unités ribosomales 18S et 28S (Pollard et Earnshaw, 2004). Quelques extractions ont été effectuées à différents moments sur des échantillons différents, mais le gel d'agarose sur lequel on vérifiait l'intégrité de l'extrait avait toujours sensiblement la même allure. Puis, le ratio de l'absorbance à 260 nm (absorbance maximale de l'ADN et de l'ARN) sur l'absorbance à 280 nm (absorbance maximale des protéines) a été vérifié. Si ce ratio se situe entre 1,5 et 1,7, on peut considérer que la qualité de l'extraction est adéquate car on y retrouve peu de

protéines. Ainsi, nous avons toujours obtenu des ratios un peu supérieur à 1,5. Pour l'extrait de la figure 3.25, le ratio était de 1,53. Étant donné que nos ratios étaient toujours assez bons, nous avons décidé de poursuivre avec nos échantillons même si la vérification sur gel d'agarose semblait peu concluante.



Figure 3.25 : Extrait d'ARN total de l'échantillon LB #10 de l'année d'échantillonnage 2008.

À partir de l'extrait de la figure 3.25, nous avons effectué un RT-PCR avec des amorces d'actine (*Rana catesbeiana*), de RBP (*Xenopus laevis*) et de TTR (*Rana catesbeiana*). Il faut noter que les blancs représentent un PCR où le produit de RT a été remplacé par de l'eau sans RNase. On peut remarquer sur la figure 3.26 qu'un produit d'environ 300 paires de bases apparaît partout sauf dans les colonnes des amorces de TTR. Des produits de 304 paires de bases pour l'actine, de 323 paires de bases pour la RBP et de 339 paires de bases pour la TTR étaient attendus. Les bandes aux alentours de 300 paires de bases pourraient donc être celles recherchées pour l'actine et la RBP. Cependant, une contamination est probable puisque des bandes apparaissent dans le blanc, mais aussi parce qu'il semble y avoir deux bandes dans les

colonnes avec les amorces d'actine. Malgré la réalisation de tests pour détecter de la contamination dans très peu d'étude, il est très fréquent d'observer de faux positifs lorsqu'on effectue un RT-PCR. En effet, de tels résultats sont détectés dans 9 à 57 % des échantillons (Borst *et al.*, 2004). Nous avons donc décidé d'effectuer un nouvel essai avec le même échantillon pour vérifier si nous obtenions les mêmes résultats.

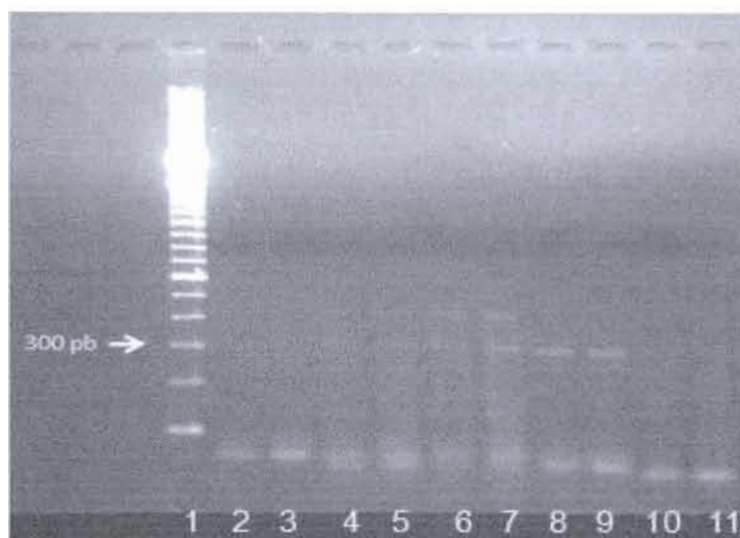


Figure 3.26 : Résultat du RT-PCR effectué sur l'extrait d'ARN de la figure 3.25. Les traitements que l'on rencontre dans chacun des puits sont les suivants : 1) échelle de poids moléculaires 2) blanc avec amorces d'actine (volume de 12 μ l) 3) blanc avec amorces d'actine (volume de 18 μ l) 4) amorce d'actine (volume de 12 μ l) 5) amorce d'actine (volume de 18 μ l) 6) amorce d'actine avec le double d'extrait (volume de 12 μ l) 7) amorce d'actine avec le double d'extrait (volume de 18 μ l) 8) amorce de RBP (volume de 12 μ l) 9) amorce de RBP (volume de 18 μ l) 10) amorce de TTR (volume de 12 μ l) 11) amorce de TTR (volume de 18 μ l).

Les résultats d'un nouvel essai sur l'extrait de la figure 3.25 sont présentés à la figure 3.27. Pour les échantillons 10 à 13, un seul ajustement a été effectué quant au 2^e cycle du PCR qui a été réalisé à 55 °C plutôt qu'à 57 °C comme dans le programme de base. Cet ajustement avait pour but de se donner toutes les chances possibles de détecter la TTR. La température optimale d'hybridation se situait autour

de 62,4 °C pour la plupart de nos amorces. Bien que normalement, le 2^e cycle soit réalisé à une température inférieure de 5 °C à la température optimale, il est courant de couvrir une plus large gamme de température lors de l'ajustement d'une méthode. Lors du premier PCR (échantillons 2 à 9), un problème est survenu et le programme ne s'est pas arrêté comme prévu après 40 cycles. Nous n'avons donc pas pu analyser cette partie du gel. Par contre, dans les échantillons 10 et 11, qui sont en fait des blancs, une bande apparaît quand même, exactement à la hauteur où on pourrait s'attendre à obtenir des bandes pour nos amorces. Cette situation nous amène encore une fois à penser que les résultats obtenus à la figure 3.26 étaient en fait de la contamination. Les sources de contamination peuvent être très diverses : eau, réactifs, récipients, transfert des échantillons, ADN génomique, instruments, etc. (Borst *et al.*, 2004). Nous avons donc vérifié chacun de ces paramètres lorsqu'il était possible de le faire. Ainsi, nous avons refait de l'eau sans RNase, utilisé un autre kit de RT et de PCR et pris des tubes bien stériles en plus de traiter chacun des instruments utilisés à la RNase. Comme la contamination demeurerait après toutes ses précautions, nous avons pensé qu'il pouvait en fait s'agir de contamination à l'ADN génomique, un type de contamination que l'on retrouve souvent avec la méthode que nous utilisons pour extraire l'ARN (Siebert et Chenchik, 1993). En effet, à cause de la sensibilité de la méthode RT-PCR, de très faibles quantités d'ADN génomique dans une préparation d'ARN peuvent être amplifiées au point de créer un faux positif (Sandoval *et al.*, 2004). Pour les puits avec des amorces de TTR (puits 8 et 9), on ne retrouve, encore une fois, pas de produit sur le gel. Cela pourrait indiquer que nous ne sommes pas encore à la température d'hybridation idéale, que l'extraction d'ARN ne fonctionne pas bien ou encore qu'il n'y a pas de TTR au niveau du foie. Cette dernière option est cependant très peu probable puisque cette protéine devrait se retrouver en quantité suffisante dans cet organe.

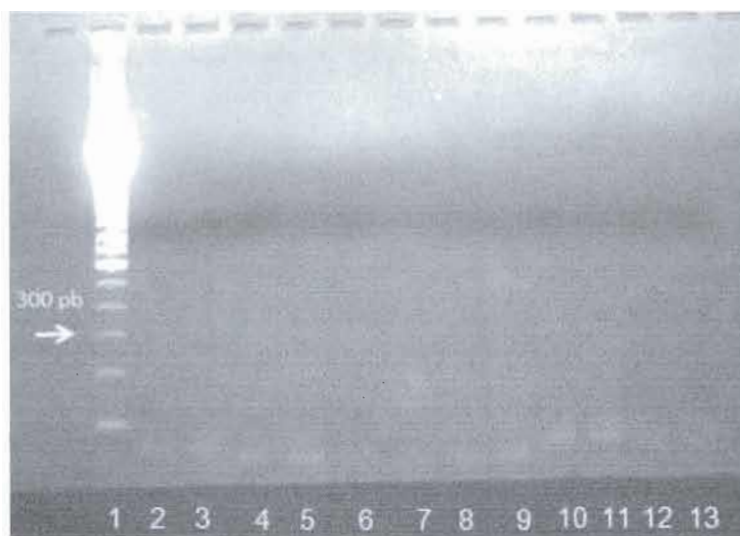


Figure 3.27: RT-PCR effectué sur l'extrait d'ARN de la figure 3.25. 1) échelle de poids moléculaires 2) blanc avec amorces d'actine avec ancienne trousse PCR (volume de 12 μ l) 3) blanc avec amorces d'actine avec ancienne trousse PCR (volume de 18 μ l) 4) blanc avec amorces d'actine avec nouvelle trousse PCR (volume de 12 μ l) 5) blanc avec amorces d'actine avec nouvelle trousse PCR (volume de 18 μ l) 6) amorce d'actine (volume de 12 μ l) 7) amorce d'actine (volume de 18 μ l) 8) amorce de TTR (volume de 12 μ l) 9) amorce de TTR (volume de 18 μ l). 10) blanc avec amorces d'actine avec ancienne trousse PCR (volume de 12 μ l) 11) blanc avec amorces d'actine avec ancienne trousse de PCR (volume de 18 μ l) 12) amorce de RBP (volume de 12 μ l) 13) amorce de RBP (volume de 18 μ l).

Suite à ces résultats, nous avons décidé d'effectuer un traitement à la DNase afin de vérifier si les bandes précédemment obtenues étaient vraiment le résultat d'une contamination à l'ADN génomique et dans le but d'éliminer cette contamination. Nous avons d'abord procédé à une nouvelle extraction du même échantillon pour s'assurer d'avoir un volume d'extrait suffisant. Le gel d'agarose de l'extrait présentait à peu près la même allure et le ratio A260/A280 était également sensiblement identique que lors de la première extraction avec une valeur de 1,54.

Nous avons donc procédé à un traitement à la DNase sur chacun des échantillons afin d'éliminer les traces de contamination à l'ADN génomique (fig.

3.28). En outre, nous avons fait un blanc de RT en plus du blanc normal afin de voir si la contamination ne se situait pas dans les produits utilisés (et ce même si nous avons testé deux kits différents). On peut donc dire que toutes les précautions ont été prises afin d'éliminer toutes les sources de contamination. Il est intéressant d'observer que suite à ces traitements, aucun produit n'a été détecté suite au RT-PCR, ce qui signifie que les résultats précédant provenaient probablement d'une contamination à l'ADN génomique.

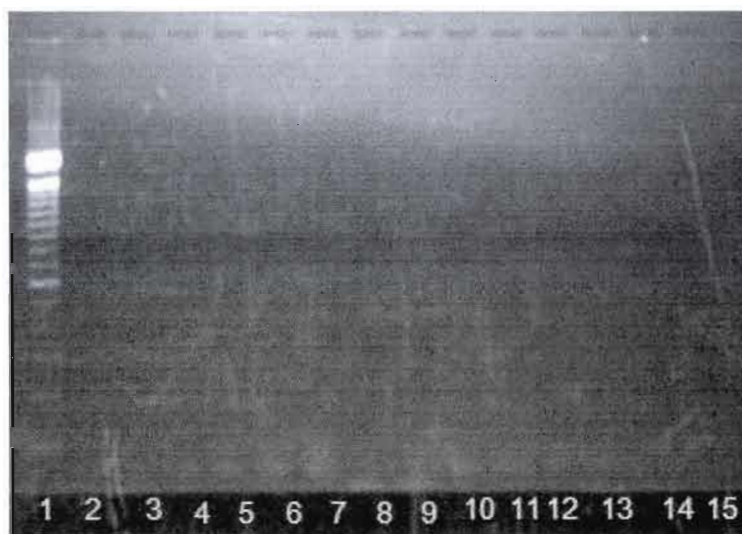


Figure 3.28 : RT-PCR effectué sur l'extrait d'ARN. Un traitement à la DNase a été effectué sur chacun des extraits avant l'étape du RT. 1) échelle de poids moléculaires 2) blanc de RT avec amorces d'actine (volume de 12 μ l) 3) blanc de RT avec amorces d'actine (volume de 18 μ l) 4) blanc avec amorces d'actine (volume 12 μ l) 5) blanc avec amorces d'actine (volume de 18 μ l) 6) amorce d'actine (volume de 12 μ l) 7) amorce d'actine (volume de 18 μ l) 8) amorce de TTR (volume de 12 μ l) 9) amorce de TTR (volume de 18 μ l). 10) blanc de RT avec amorces d'actine (volume de 12 μ l) 11) blanc de RT avec amorces d'actine (volume de 18 μ l) 12) blanc avec amorces d'actine (volume de 12 μ l) 13) blanc avec amorces d'actine (volume de 18 μ l) 14) amorce de RBP (volume de 12 μ l) 15) amorce de RBP (volume de 18 μ l).

Cependant, avant de conclure à la contamination, quelques modifications au protocole demeuraient à tester. En utilisant seulement des amorces d'actine, nous avons fait varier les paramètres du protocole une à une afin de se donner le plus de chances possibles de détecter des produits. Ainsi, nous avons effectué des PCR avec des cycles d'hybridation à 55 °C, 58 °C et 60 °C afin de balayer une bonne gamme de températures d'hybridation. Cette variation de température n'a malheureusement pas permis de détecter aucun produit. Nous avons également tenté d'utiliser le double de la quantité d'extrait d'ARN afin de maximiser nos chances qu'il y ait amplification de l'ARNm d'actine. Cette tentative a été effectuée à une température d'hybridation de 58 °C sans obtenir les résultats escomptés. Finalement, pendant l'étape de la transcriptase reverse, nous avons utilisé des amorces anti-sens d'actine au lieu d'utiliser des amorces d'hexamère afin de cibler spécifiquement l'ARN d'actine dès l'étape du RT. Aucun produit n'a été détecté dans cet ultime essai. Il faut également noter qu'un résultat surprenant est apparu. En effet, il fut impossible de détecter une bande dans un puits où aucun traitement à la DNase n'a été effectué. Nous aurions dû voir apparaître un produit si nous avions à faire à une contamination à l'ADN génomique. Nous pouvons, malgré tout, soupçonner une contamination quelconque lors de l'essai présenté en 3.26 car nous n'avons jamais réussi à reproduire ces résultats.

Puisque nous soupçonnions encore de la contamination à l'ADN génomique, celle-ci étant, comme nous l'avons mentionné précédemment, très fréquente lors d'extraction avec la méthode que nous utilisons (Siebert et Chenchik, 1993), nous avons décidé d'effectuer un extrait sur un nouvel échantillon et de réévaluer l'impact d'un traitement à l'ADN génomique. Le gel de l'intégrité de ce nouvel extrait ressemblait à ceux obtenus précédemment, mais le ratio A260/A280 était plus élevé (1,65).

Les résultats du RT-PCR de la figure 3.29 nous ont permis de voir clairement l'impact de la contamination à l'ADN génomique. En effet, aucun produit n'a été détecté dans le puits où il y a eu traitement à la DNase (puits #1) et dans le blanc (puits #3) alors qu'une bande apparaît clairement dans l'échantillon non-traité à la DNase (puits #2). En outre, ce produit se retrouve sensiblement au même niveau que les produits que nous avons détectés dans les RT-PCR précédents. La seule différence est que, cette fois-ci, nous n'avons pas obtenu de produit dans le blanc. On peut donc supposer que le blanc, qui était contaminé dans l'essai précédent, n'a pas été contaminé lors de cet essai. Nous avons aussi vérifié l'intégrité des amorces d'actine qui auraient pu faire défaut, mais elles fonctionnaient très bien pour une étudiante qui travaillait avec des cultures cellulaires primaires provenant d'os de ouaouarons.

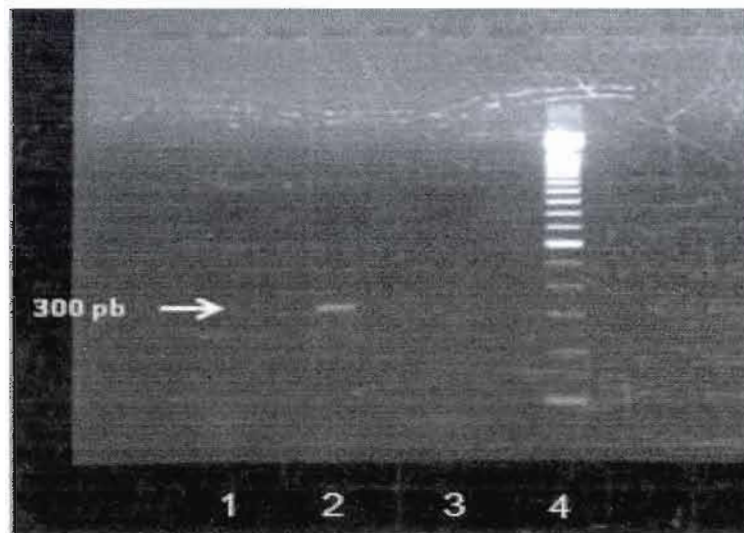


Figure 3.29 : RT-PCR effectué sur l'extrait d'ARN. 1) amorces d'actine avec un extrait traité à la DNase 2) amorces d'actine avec un extrait non-traité à la DNase 3) blanc avec amorces d'actine 4) échelle de poids moléculaires. Les volumes dans les puits sont tous de 12 μ l. Le 2^e cycle du PCR a été effectué à 58 °C pour chaque échantillon.

À ce moment, nous avons décidé de tester l'efficacité de l'extraction de l'ARN et notre méthode RT-PCR avec d'autres tissus provenant aussi de ouaouarons. En effet, il est possible qu'il soit difficile d'extraire l'ARN du foie pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il a été démontré que l'extraction d'ARN à partir de tissus riches en RNase, comme le foie, est un processus très laborieux (Bahar *et al.*, 2007; Skrypina *et al.*, 2003). Cette forte teneur en RNase provoquerait une baisse de la stabilité de l'ARN qui est plus rapidement dégradé dans ces tissus (Bahar *et al.*, 2007). Dans la méthode que nous utilisons, des précautions sont prises afin de dénaturer les protéines, dont les RNases. Malgré tout, les fortes concentrations de ces enzymes dans le foie pourraient quand même causer une dégradation non-négligeable de l'ARN. En effet, il semble que l'utilisation de phénol ne permet pas d'inhiber de façon complète l'activité des RNases (Kaplan *et al.*, 1979). En outre, il est possible que notre difficulté à isoler l'ARN du foie provienne du fait que ce tissu a été décongelé et recongelé à plusieurs reprises pour différentes analyses. Une étude de Thompson *et al.* (2007) démontre en effet que le fait de congeler les tissus affecte leur structure et que le processus de décongélation peut affecter l'intégrité de l'ARN. Afin d'obtenir une meilleure intégrité de notre ARN, il aurait été préférable de séparer le foie en petit morceau lors de l'échantillonnage et de congeler notre tissu en petits morceaux. Cette façon de faire diminue le nombre de fois que l'on décongèle chacun des morceaux et le fait de décongeler un plus petit morceau diminue l'impact sur la dégradation de l'ARN (Thompson *et al.*, 2007). Cependant, il faut noter que nous avons tenté de décongeler le moins possible notre tissu en coupant des tranches à même le tissu congelé. Bien que cette mesure soit tout de même efficace, il est très probable que certaines parties de notre tissu aient subies une décongélation pendant le processus. Une autre source de variabilité concernant l'isolation de l'ARN provient du fait que les morceaux de tissu utilisés ne sont pas nécessairement homogènes. Cela peut provoquer des différences entre deux échantillons provenant d'un même tissu (Freeman *et al.*, 1999). Finalement, il importe de mentionner que l'isolation de l'ARN est un processus plus laborieux dans

les tissus riches en lipides. Puisque le foie constitue l'organe central de gestion du métabolisme et du transport des lipides (Marieb, 1999), il contient de grandes quantités de molécules lipidiques et il est possible que l'isolation de l'ARN ait été plus difficile en raison de cette caractéristique.

Nous avons donc décidé de procéder à une extraction à partir de deux autres tissus provenant des mêmes ouaouarons (fig. 3.30). Ainsi, nous pouvons voir que l'intégrité de l'extrait semble excellente dans le cas des muscles (puits #1) puisque l'on peut aisément identifier les sous-unités ribosomales 18S et 28S. Par contre, dans le cas des reins (puits #2), l'extraction semble avoir moins bien fonctionné puisqu'on ne distingue pas les deux bandes. La contamination par des protéines des deux différents tissus semble aussi très faible selon le ratio A260/A280 (1,68 pour les muscles et 1,55 pour les reins). Il est possible de constater que l'efficacité de l'extraction peut être très différente selon les tissus utilisés. Finalement, le fait que de bons résultats avec les muscles aient été obtenus confirme que la méthode était exécutée adéquatement mais qu'elle ne semble pas convenir à l'extraction de l'ARN à partir du foie.

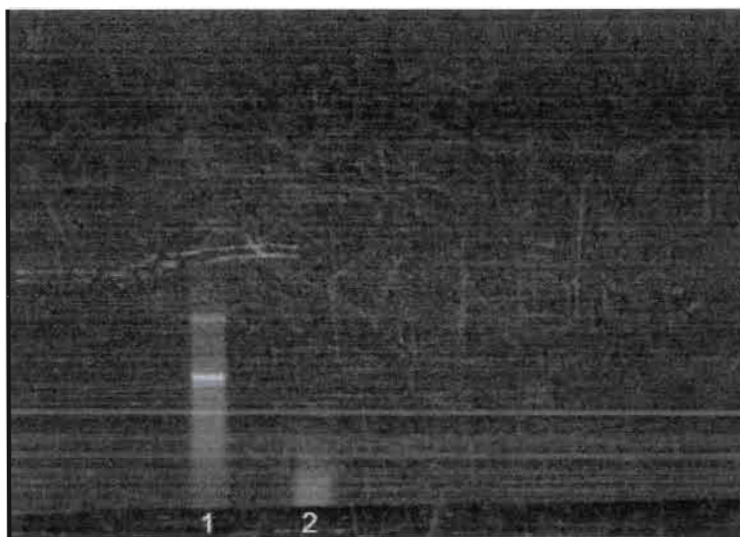


Figure 3.30 : Extrait d'ARN total des muscles (1) et des reins (2) de l'échantillon DS #2 de l'année d'échantillonnage 2008.

Les résultats de RT-PCR pour ces deux tissus sont très révélateurs (Fig. 3.31). En effet, il ne semble pas y avoir de contamination puisqu'il n'y a pas de bande formée dans le puits contenant le blanc (puits #2). En outre, pour les muscles, on observe des bandes d'intensité similaire avec et sans traitement à la DNase (puits #4 et #3 respectivement). Cela indique qu'il n'y a pas de contamination génomique dans notre échantillon et on peut penser que les produits obtenus sont le résultat d'une amplification efficace des ARN d'actine dans le muscle. Pour ce qui est du tissu rénal, on observe une bande de plus faible intensité lorsque l'on n'effectue pas de traitement à la DNase (puits #5) alors qu'aucun produit n'apparaît à la suite d'un traitement à la DNase (puits #6). On retrouve donc pour les reins, les mêmes problèmes que lorsqu'on utilise le foie. En effet, l'extraction apparaît très peu efficace selon l'intégrité que l'on observe sur le gel d'agarose et l'extrait semble contaminé à l'ADN génomique.

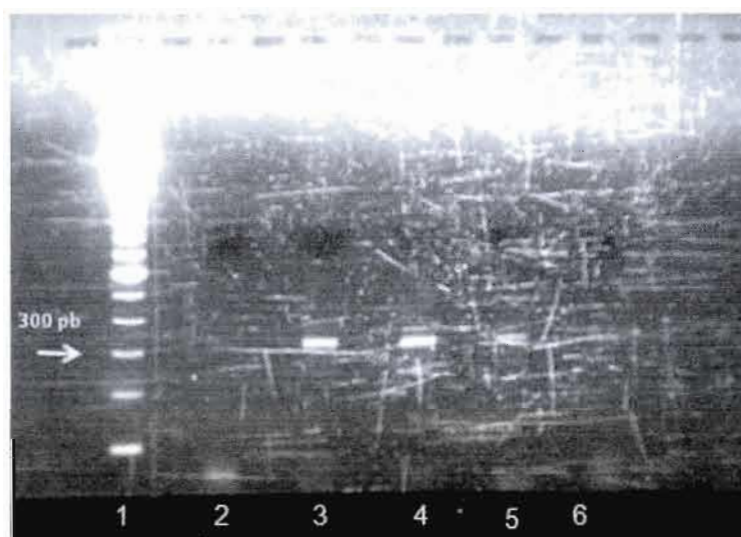


Figure 3.31 : RT-PCR effectué sur les extraits d'ARN de la figure 3.33. 1) échelle de poids moléculaires 2) blanc avec amorces d'actine 3) amorces d'actine sur l'extrait de muscles sans traitement à la DNase 4) amorces d'actine sur l'extrait de muscles avec traitement à la DNase 5) amorces d'actine sur l'extrait de reins sans traitement à la DNase 6) amorces d'actine sur l'extrait de reins avec traitement à la DNase. Le 2^e cycle du PCR a été effectué à 58 °C pour chaque échantillon.

Finalement, certains auteurs travaillent avec le gène du facteur d'élongation EF 1- α de *Xenopus laevis* comme contrôle interne plutôt qu'avec l'actine (Levy *et al.*, 2004; Yamauchi *et al.*, 1998). En fait, ce contrôle interne est utilisé parce que les quantités d'ARNm de ce gène ne varient pas pendant la métamorphose (Amano *et al.*, 1998). Cette séquence, même si elle provient d'une autre espèce (*Xenopus laevis*), semble fonctionner avec le ouaouaron (Yamauchi *et al.*, 1998). Les résultats du RT-PCR avec cette nouvelle amorce n'ont pas permis de détecter de produit. Cela confirme encore une fois que les extraits d'ARN provenant du foie sont trop dégradés pour être utilisés en RT-PCR.

À la lumière des résultats obtenus et présentés dans cette section, il apparaît impératif qu'une amélioration de la méthode d'extraction avec des tissus provenant du foie doit être réalisée dans un avenir rapproché. Cela permettra en effet de faire la lumière sur l'impact des contaminants d'origine agricole sur la synthèse de protéines de transport importantes non seulement pour l'homéostasie des rétinoïdes, mais aussi essentielles à un maintien du transport des hormones thyroïdiennes. Étant donné l'importance de ces deux groupes de molécules sur plusieurs fonctions physiologiques essentielles (Smith *et al.*, 2002; Barua et Furr, 1998), une poursuite de ces travaux pourrait amener des avancées importantes dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 Analyses d'eau

Bien que nos sites soient classés selon un gradient d'agriculture (Primeau *et al.*, 1999), les analyses d'eau sont tout de même importantes afin de savoir à quel type de mélange les ouaouarons échantillonnés sont exposés, mais aussi pour valider le classement de nos sites. Ainsi, les résultats permettent de confirmer que les sites de moyenne et de forte intensité agricole présentent une concentration plus élevée en métolachlore et en atrazine (Tab. A.3 et A.4), deux des pesticides les plus couramment retrouvés dans les cours d'eau à proximité de cultures à grandes interlignes (Giroux *et al.*, 2006; Frank et Sirons, 1979). En outre, on peut remarquer, dans les tableaux A.3 et A.4, que les concentrations en pesticides sont presque systématiquement plus élevées au site de la rivière Noire.

La présence d'atrazine est très préoccupante parce qu'il s'agit d'un pesticide persistant qui est présent dans les eaux de surface, mais aussi les eaux souterraines et qui agit à de très faibles doses (Hayes *et al.*, 2006). Chez *Xenopus laevis*, l'atrazine pourrait agir en tant que perturbateur endocrinien à partir de concentrations de l'ordre de 0,1 µg/l (Hayes *et al.*, 2002). La situation est donc préoccupante puisque les concentrations à la Rivière Noire étaient de 0,91 µg/l en 2007 et de 0,61 µg/l en 2008. Des effets pourraient survenir à des concentrations beaucoup plus faibles que celles-ci, sans compter qu'il y a un effet additif ou synergique possible avec d'autres contaminants (Hayes *et al.*, 2006). D'autres études de terrain ont suggéré une tendance entre l'exposition à l'atrazine et une altération du système reproducteur (Reeder *et al.*, 1998). En plus d'agir comme perturbateur endocrinien, l'atrazine, à

des concentrations variant entre 0,1 µg/l et 25 µg/l, pourrait augmenter l'incidence des anomalies des gonades, provoquer une diminution de la taille du muscle du larynx et perturber les concentrations d'hormones stéroïdiennes chez les mâles de l'espèce *Xenopus laevis* (Hayes *et al.*, 2002). Cependant, une controverse subsiste quant à l'impact de l'atrazine sur la santé des grenouilles. En effet, d'autres études démontrent qu'il n'y a aucun effet significatif à des concentrations semblables (Carr *et al.*, 2003). Ces contradictions démontrent bien qu'il est essentiel de procéder à des études supplémentaires sur le sujet afin d'en arriver à des évidences plus claires. Cependant, il ne faut pas oublier que certaines de ces études ont été effectuées en laboratoire et qu'elle ne reflète ainsi pas toutes les conditions que l'on retrouve en milieu naturel.

En ce qui concerne le métolachlore, bien qu'il s'agisse d'un contaminant fréquemment détecté dans les eaux de surface, très peu de données sur la toxicité aiguë et chronique sont disponibles. En outre, à ce jour, il n'y a pas assez d'évidences pour conclure en une perturbation endocrinienne (Takacs *et al.*, 2002). Une étude réalisée sur trois espèces de têtards (*Bufo americanus*, *Pseudacris triseriata* et *Hyla versicolor*) démontre d'ailleurs qu'une exposition allant jusqu'à 10 µg/l n'affecte pas la survie, le poids à la métamorphose et le temps nécessaire pour effectuer la métamorphose chez ces organismes (Williams et Semlitsch, 2009). On sait cependant que l'action combinée de l'atrazine et du métolachlore présents dans un mélange est plus importante que l'effet de l'atrazine seulement, suggérant ainsi un effet additif ou synergique entre les deux pesticides (Hayes *et al.*, 2006).

Les nitrites et les nitrates sont deux contaminants que l'on retrouve dans nos cours d'eau (Tab A.1 et A.2). Ces substances agissent sur les organismes aquatiques en modifiant les pigments responsables du transport de l'oxygène en les rendant incapables d'accomplir cette tâche essentielle (Camargo *et al.*, 2005; Lewis et Morris, 1986). Les nitrites et les nitrates ainsi que le phosphore sont des substances

couramment détectées dans les milieux agricoles. Il est donc peu surprenant que nous les détectons en plus grande concentration à la rivière Noire et cela, pour les deux années d'échantillonnage. La situation est plus préoccupante pour l'année 2008 car les concentrations détectées sont jusqu'à environ huit fois plus élevées qu'au cours de l'année précédente (5,43 mg/l en 2008 comparativement à 0,71 mg/l au site de la rivière Noire par exemple). Ces concentrations sont inquiétantes pour la santé des organismes aquatiques. En effet, certaines études dénotent une CL₅₀ aussi basse que 2 mg/l pour les espèces d'amphibiens suivantes : *Rana pretiosa*, *Rana aurora*, *Bufo boreas*, *Hyla regilla* et *Ambystoma gracile* (Marco *et al.*, 1999). Chez les grenouilles exposées aux nitrates, la CL₅₀ varie grandement selon l'espèce, le stade de développement et selon que l'on a affaire à une exposition aiguë ou chronique. Par exemple, elle a été établie à 5 mg/l pour les larves de l'espèce *Rana temporaria* exposées sur une période de 10 semaines selon une étude de Johansson *et al.* (2001) alors qu'elle est de 1236,2 mg/l chez les têtards de l'espèce *Xenopus laevis* exposés pendant 240 heures (Schuytema et Nebeker, 1999). En outre, les concentrations de l'ordre de 5 mg/l détectées à la rivière Noire sont quelque peu préoccupantes pour la santé humaine puisque nous sommes tout près de la concentration maximale recommandée pour l'eau potable qui est de 10 mg/l² (Carmago *et al.*, 2005). On suggère d'ailleurs de faire un suivi au moins deux fois par année dans les cours d'eau où la ponctuelle, il est possible que des concentrations plus élevées soient détectées à d'autres moments au cours de l'été. C'est pourquoi il serait important de faire des analyses supplémentaires à différentes périodes de la saison estivale.

En outre, il est important de mentionner que le mélange des pesticides avec les fertilisants contenant des nitrates et des nitrites peut engendrer un effet additif ou synergique. Une étude réalisée avec des embryons de souris démontrent qu'il n'y a pas d'impact sur le pourcentage des blastocytes en développement lors d'une

² www.mddep.gouv.qc.ca/eau/potable/index.htm

exposition à du nitrate d'ammonium, mais qu'il y a un effet néfaste lors d'une exposition à un mélange d'atrazine, de métolachlore et de nitrate d'ammonium (Greenlee *et al.*, 2004). Une autre étude a fait ressortir un impact d'un mélange d'aldicarbe, d'atrazine et de nitrate sur la santé de deux espèces de souris. En effet, des impacts sur le comportement et sur les systèmes endocrinien et immunitaire ont été relevés chez les souris exposées au mélange alors que l'exposition à une seule de ces substances n'a pas provoqué d'effet (Jaeger *et al.*, 1999). Un effet de féminisation chez la grenouille léopard (*Rana pipiens*) a également été avancé dans une étude de Orton *et al.* (2006). Dans une étude en mésocosmes, les grenouilles exposées à un mélange de nitrates et d'atrazine (10 mg/l et 10 µg/l respectivement) ont présenté un ratio femelles/mâles plus élevé que chez les grenouilles du traitement de contrôle. Cette modification du ratio n'est pas apparue lors d'une exposition à l'atrazine seulement ou aux nitrates seulement. Ce résultat démontre clairement l'effet additif ou synergique que peut avoir un mélange de fertilisants et de pesticides.

4.2 Résultats rétinoïdes 2007

En premier lieu, les concentrations de rétinol dans le plasma ont été analysées à chacun des sites. Ainsi, on observe une différence significative seulement chez les mâles pour lesquels les concentrations de rétinol sont plus faibles dans le plasma des ouaouarons provenant de la rivière Noire par rapport aux ouaouarons de chacun des autres sites (fig. 3.1). Les résultats obtenus pour les mâles de l'année 2007 permettent donc de supposer un impact des contaminants agricoles sur l'homéostasie du rétinol plasmatique. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment par Bérubé *et al.* (2005). Dans cette étude, les ouaouarons provenant des sites de forte intensité agricole présentaient de plus faibles concentrations de rétinol plasmatique. Ce constat n'a pas seulement été fait chez les amphibiens. De nombreuses études rapportent une tendance similaire chez des oiseaux, des poissons et des mammifères exposés à différents contaminants d'origine agricole ou non. Ainsi, une corrélation négative a été établie entre le rétinol plasmatique et la concentration totale de BPC dans le

plasma dans une étude s'intéressant aux grands hérons (*Ardea herodias*) vivant dans des colonies du fleuve Saint-Laurent et ses estuaires (Champoux *et al.*, 2006). Une étude réalisée en mésocosmes avec des flets communs (*Platichthys flesus*) met pour sa part en évidence une baisse du rétinol plasmatique chez les individus exposés à des rejets d'origine agricole (Besselink *et al.*, 1998). Enfin, on a remarqué que les concentrations de rétinol plasmatique diminuaient de façon linéaire avec une augmentation des concentrations de BPC dans le plasma chez des ours polaires (*Ursus maritimus*) capturés dans l'archipel de Spitzberg au nord de la Norvège (Skaare *et al.*, 2001).

On peut aussi noter dans le graphique 3.1 que la baisse de rétinol plasmatique au site de la rivière Noire est plus marquée chez les mâles que chez les femelles. On peut donc penser que la contamination agricole provoque un impact plus important chez les mâles que chez les femelles en ce qui concerne cette variable. Il serait intéressant d'augmenter l'effectif des femelles afin de voir si cette tendance est conservée.

Chez l'humain, parmi tous les types de micronutriments dont la concentration est régulée, la vitamine A est celui sur lequel le corps exerce le contrôle le plus complexe (Thurnham et Northrop-Clewes, 1999). Une carence en vitamine A dans l'alimentation provoque un impact sur les niveaux de rétinol plasmatique seulement lorsque les réserves hépatiques de rétinol sont épuisées (Thurnham et Northrop-Clewes, 1999; Blomhoff *et al.*, 1991). Il est donc possible que la baisse de rétinol dans le plasma s'explique par une carence alimentaire. Cependant, à ce moment, les réserves de rétinol dans le foie seraient aussi affectées. Il est donc essentiel d'analyser les rétinol hépatiques afin de voir si une carence alimentaire peut être responsable des baisses observées au niveau plasmatique. Il importe de vérifier les concentrations de rétinol hépatique, mais aussi les niveaux de la forme de stockage des rétinol, c'est-à-dire les esters de rétinol. Ce ratio nous donne, en effet, une

bonne idée de la dynamique au niveau des formes de rétinoïdes présentes dans le foie, les esters étant la forme de stockage et le rétinol étant la forme destinée à être transportée.

Pour l'année 2007 aucune différence significative n'est détectée entre la concentration de rétinol hépatique de chacun des sites que ce soit pour les mâles, pour les femelles ou pour l'ensemble des données (fig. 3.2). Ainsi, la baisse de rétinol plasmatique observée chez les mâles ne serait apparemment pas causée par une baisse concomitante du rétinol hépatique. Une carence alimentaire chez les mâles de la rivière Noire ne semble donc pas en cause. Ces résultats pour le rétinol hépatique sont quelque peu différents de ceux obtenus pour les mâles capturés lors du terrain de 2003 (Boily *et al.*, 2005). En effet, à ce moment on observait une baisse significative du rétinol hépatique à la rivière Noire lorsque l'on comparait avec le site de faible intensité agricole de la rivière Yamaska-Nord. Ce dernier site n'était pas inclus dans notre échantillonnage et il est donc impossible de faire une comparaison. Cependant, en 2003, aucune différence significative n'avait été observée entre le site de Deborah Stairs et le site de la rivière Noire comme c'est le cas dans notre étude. Lors de la campagne d'échantillonnage de 2004, on a plutôt observé l'inverse, c'est-à-dire que les concentrations de rétinol hépatique étaient plus élevées dans les sites de forte intensité agricole (Boily *et al.*, 2009). Cette étude, tout comme la nôtre, effectuée en 2007, indique que le rétinol hépatique ne serait pas influencé par la contamination agricole. Les résultats obtenus chez d'autres espèces sont aussi très variables et il est difficile d'établir une tendance universelle. Tout d'abord, les résultats obtenus chez les flets exposés à des rejets agricoles diffèrent des nôtres puisque les concentrations de rétinol hépatique chez ceux-ci sont significativement plus faibles que pour les flets des bassins de contrôle (Besselink *et al.*, 1998). À l'opposé, chez une espèce de grenouille (*Rana temporaria*) exposé au p,p'-DDE, on observe une hausse des concentrations de rétinol dans le foie lorsque la dose d'exposition est de 10 mg de p,p'-DDE par kg de masse corporelle (Leiva-Presa *et al.*, 2006). Il semble donc y

avoir une grande disparité entre les espèces. De plus, ces deux études ayant été effectuées en laboratoire, il est difficile de comparer avec ce qui se passe sur le terrain alors que les animaux sont exposés à un mélange de plusieurs contaminants.

En ce qui concerne les esters de rétinol hépatiques en 2007 (fig. 3.3) chez les mâles, les concentrations sont significativement plus faibles à la rivière Pot-au-Beurre par rapport à tous les autres sites et significativement plus élevées au lac Boivin en comparaison de tous les autres sites, sauf au réservoir Choinière. Une différence entre les mâles du Lac Boivin et ceux de la rivière Pot-au-Beurre est aussi observée pour les ouaouarons échantillonnés en 2008 (fig. 3.8), ce qui vient appuyer les résultats de 2007. Chez les femelles, les concentrations à la rivière Noire ne sont pas différentes d'aucun autre site alors que les concentrations pour la rivière Yamaska et le réservoir Choinière sont plus faibles que celles retrouvées au lac Boivin. Il semble donc y avoir une différence entre les mâles et les femelles. Lorsque l'on regarde la tendance pour l'ensemble des données, les concentrations d'esters de rétinol ne sont pas significativement différentes entre les sites. Au général, les réserves à la rivière Noire apparaissent semblables à celle des autres sites si on exclut le Lac Boivin. Cette situation ne semble pas trop anormale puisque l'enzyme HER hydrolyse les esters de rétinol en rétinol lorsque l'organisme a besoin de cette molécule (Noy, 2000). Ainsi, il est normal de voir une bonne correspondance entre le rétinol hépatique et les esters de rétinol hépatiques. S'il y avait un manque d'esters de rétinol hépatiques, il y aurait possiblement une baisse concomitante des niveaux de rétinol hépatique. Dans l'étude de Boily *et al.* (2005) réalisée avec les grenouilles capturées à l'été 2003, les concentrations d'esters totaux dans le foie des mâles de la rivière Noire ne présentaient aucune différence significative avec les niveaux observés dans les autres sites. Nous obtenons les mêmes résultats sauf pour les mâles de la rivière Pot-au-Beurre qui présentent de très faibles concentrations en esters de rétinol et ceux du lac Boivin qui possèdent une très grande réserve d'esters de rétinol. À l'opposé, les ouaouarons capturés en 2004 disposaient de plus faibles niveaux d'esters de rétinol

dans les sites de forte intensité agricole (Boily *et al.*, 2009). Ces différences peuvent peut-être s'expliquer par une carence dans l'alimentation dans les sites de forte intensité agricole de 2004. Au site de Pot-au-Beurre on peut penser qu'une substance non mesurée dans notre étude, présente depuis quelques années seulement, puisse altérer le métabolisme des rétinoïdes à un tel point que les concentrations d'esters de rétinol détectées en 2007 sont très faibles chez les organismes provenant de ce site. La rivière Pot-au-Beurre se trouve d'ailleurs dans la région de Sorel, une ville très industrielle. On peut donc penser que des contaminants d'origine industrielle, comme les métaux, les BPC, les HAP, les dioxines et les furannes, ont pu altérer les réserves de rétinoïdes des ouaouarons vivant à proximité. D'ailleurs, une étude réalisée chez la barbotte brune (*Ameiurus nebulosus*) indique une baisse des concentrations de palmitate de rétinol dans le foie des individus provenant de sites contaminés par des substances chimiques, en particulier des HAP (Arcand-Hoy et Metcalfe, 1999). Par contre, dans l'étude réalisée chez les flets, il n'y a pas de différence significative entre les concentrations de palmitate de rétinol détectées chez les flets du mésocosme témoin et les concentrations chez les flets du mésocosme exposé aux rejets agricoles (Besselink *et al.*, 1998). Chez *Rana temporaria*, dans une étude de laboratoire, il n'y a aucune différence significative entre les niveaux de palmitate de rétinol lors d'une exposition à différentes concentrations de *p,p'*-DDE (Leiva-Presa *et al.*, 2006). Il semble donc y avoir une grande disparité entre les espèces et il est donc difficile d'établir un schème général de réponse précis. Les types de contaminants auxquels sont exposés les animaux pourraient aussi causer des impacts différents sur le métabolisme des rétinoïdes. Il importe aussi de mentionner qu'en 2008, les tests d'eau (fig. A.4) montrent que les concentrations de dééthyl-atrazine, d'atrazine et de métolachlore sont beaucoup plus élevées au site de la rivière Pot-au-Beurre qu'au site du Lac Boivin. Cette situation pourrait être en lien avec les résultats obtenus pour les esters de rétinol. Il faut noter qu'on ne peut comparer avec les tests d'eau de 2007 car des ennuis techniques ont empêché les mesures au site du Lac Boivin.

Afin d'investiguer davantage, il est intéressant d'observer le ratio entre la forme de stockage et la forme disponible pour le transport (esters de rétinol sur rétinol) dans le foie. Ainsi, la seule différence significative apparaît pour l'ensemble des données entre le site de la rivière Noire et le site du lac Boivin (fig. 3.4). Il est cependant évident que le plus grand ratio au Lac Boivin s'explique par une grande quantité d'esters de rétinol dans le foie. En ce qui concerne le groupe des mâles et le groupe des femelles, aucune différence significative n'est relevée entre les sites. En 2003, pour les mâles, il n'y avait aucune différence significative entre les sites en ce qui concerne le ratio palmitate de rétinol sur rétinol (Boily *et al.*, 2005). Ces résultats sont donc identiques à ceux que nous avons obtenus pour le groupe des mâles. Pour l'ensemble des données, il est difficile de comparer entre les deux années puisque le site du Lac-Boivin ne faisait pas partie de l'étude et que les femelles non pas été incluses dans l'étude de 2003. Il faut aussi souligner que le palmitate de rétinol était utilisé pour faire le ratio alors que dans notre cas, nous utilisons l'ensemble des esters hépatiques. On peut par contre affirmer que nos résultats semblent indiquer que la transformation d'esters de rétinol en rétinol se fait efficacement au niveau du foie puisque les ratios entre ces deux formes sont similaires entre les sites.

Finalement, le ratio rétinol plasmatique sur rétinol hépatique nous donne une idée de la facilité avec laquelle cette molécule passe du foie vers le sang pour être transportée aux tissus cibles. Ainsi, aucune différence significative n'est observée pour ce paramètre en 2007 (fig. 3.5). Ce ratio semble par contre un peu plus faible pour les sites de la rivière Noire et du lac Boivin. Alors que cette situation s'explique surtout par les fortes réserves de rétinoïdes hépatiques chez les ouaouarons du lac Boivin, il s'explique par une faible quantité de rétinol dans le plasma des grenouilles de la rivière Noire.

En bref, les résultats de la campagne de 2007 nous démontrent la présence de faibles concentrations de rétinol dans le plasma, mais sans baisse concomitante des

niveaux de rétinoïdes hépatiques chez les ouaouarons du site de haute intensité agricole (rivière Noire). Il ne semble donc pas y avoir de problème en ce qui concerne les réserves de rétinol chez ces organismes. Ce constat est en accord avec la littérature puisque lors de la campagne de 2004, il a été constaté que même si le rétinol hépatique est disponible dans les sites de haute activité agricole, il est moins bien mobilisé dans la circulation sanguine qu'aux sites de faible intensité agricole (Boily *et al.*, 2009). L'impact des contaminants agricoles pourrait donc se situer en aval du métabolisme hépatique, ce qui nous amène à penser que le transport du rétinol dans le sang pourrait être altéré par les polluants agricoles. Plusieurs autres molécules étant transportées dans le sang par une protéine de transport voient leur concentration plasmatique diminuer de façon significative lorsque l'organisme est exposé à un contaminant. Plus particulièrement, une baisse des hormones thyroïdiennes est observée lors d'une exposition aux BPC et au *p,p'*-DDE chez des éléphants de mer (*Mirounga angustirostris*) de la Californie (Beckmen *et al.*, 1997). Ces résultats furent également obtenus chez le phoque commun (*Phoca vitulina*) en captivité (Brouwer *et al.*, 1989). Chez les oiseaux, des baisses de T₃ ont aussi été détectées chez des sternes communes (*Sterna hirundo*) exposées à des dioxines (Murk *et al.*, 1996). Ces résultats nous poussent à croire que les contaminants pourraient en fait s'attaquer aux protéines de transport et ainsi causer une diminution des niveaux de ces molécules. Puisque le rétinol est transporté par la RBP et la TTR dans le sang (Monaco, 2000), nous avons tenté de déterminer si la pollution agricole provoque une altération de ces protéines de transport. Les résultats sont présentés aux annexes A et B.

4.3 Résultats rétinoïdes 2008

Les mêmes paramètres ont été mesurés chez les ouaouarons capturés au cours de l'été 2008, ce qui permet de faire un suivi dans le temps des niveaux de rétinoïdes dans le foie et le plasma des individus provenant des mêmes sites.

Chez les mâles, les concentrations plasmatiques de rétinol (fig. 3.6) suivent la même tendance qu'en 2007. Le gradient agricole semble même plus marqué puisque les concentrations sont significativement plus faibles à la rivière Noire par rapport aux deux sites de faible intensité agricole seulement (Deborah Stairs et lac Boivin). Le gradient agricole semble donc avoir un impact très net avec les concentrations les plus élevées aux sites de faible intensité agricole, des niveaux intermédiaires aux sites de moyenne intensité agricole et les concentrations les plus basses à la rivière Noire. Tout comme en 2007, aucune différence significative n'est remarquée entre les sites chez les femelles. Cependant, les résultats pour l'ensemble des données sont comparables à ceux obtenus pour les mâles avec de plus faibles concentrations à la rivière Noire. On ne remarque d'ailleurs pas d'effet plus important chez les mâles que chez les femelles au site de la rivière Noire comme au cours de l'année 2007. Les ouaouarons des deux sexes semblent présenter des baisses similaires de rétinol plasmatique au site de la rivière Noire, que ce soit chez les mâles ou chez les femelles. Ces données confirment encore une fois les résultats obtenus en 2003 par Bérubé *et al.* (2005). On peut donc voir que les différences entre les concentrations plasmatiques selon les sites subsistent au fil des années. Les effets de la contamination agricole semblent donc permanents en ce qui a trait aux niveaux de rétinol plasmatique chez les ouaouarons du bassin de la rivière Yamaska.

Cette constance entre les années n'est malheureusement pas observée pour tous les paramètres. Alors qu'en 2007, il n'y avait aucune différence significative pour le rétinol hépatique entre les sites, en 2008, les concentrations à la rivière Pot-au-Beurre et à la rivière Noire sont plus faibles que celles observées au lac Boivin, et ce, autant pour les mâles que pour l'ensemble des données (fig. 3.7). Bien que le gradient agricole ne semble pas avoir d'impact pour le rétinol hépatique en 2007, l'effet semble bien présent pour les grenouilles de l'année 2008. En effet, les sites de faible intensité agricole présentent les concentrations de rétinol dans le foie les plus élevées alors que les plus faibles se retrouvent entre autres à la rivière Noire. La

différence significative n'est pas relevée chez les femelles, mais, malgré tout, un patron similaire est observé avec des concentrations plus élevées dans les sites de faible intensité agricole de Deborah Stairs et du lac Boivin et des concentrations plus faibles aux sites de la rivière Pot-au-Beurre et de la rivière Noire. Les résultats de 2008, bien que différents de ceux de 2003 (Boily *et al.*, 2005) et de 2007, trouvent certains appuient dans la littérature pour des études ayant été réalisées chez d'autres espèces. En effet, comme nous le mentionnions précédemment, les concentrations de rétinol hépatique chez les flets exposés à des rejets agricoles sont plus faibles que chez les organismes provenant de mésocosmes témoins (Besselink *et al.*, 1998). De même, chez le meunier noir, une étude dénote que les individus provenant de sites pollués près de Montréal présentent des concentrations en rétinol hépatique plus faibles que les individus échantillonnés en amont à un site témoin (Branchaud *et al.*, 1993). Comme nous le mentionnions précédemment, les résultats semblent très variables entre les espèces et il est donc très difficile d'en tirer des conclusions claires.

Lorsque l'on observe les résultats pour les esters de rétinol et que l'on compare avec les résultats de 2007, quelques différences surgissent, mais une certaine tendance est conservée (fig. 3.8). En effet, les mâles de Pot-au-Beurre présentent des concentrations significativement plus faibles que ceux du Lac-Boivin. Les différences semblent cependant moins marquées que pour l'année 2007 puisque les autres sites ne sont pas différents ni du Lac-Boivin ni de la rivière Pot-au-Beurre. Pour les femelles, les résultats sont très semblables puisque les concentrations au lac Boivin sont significativement plus élevées qu'à tous les autres sites sauf Deborah Stairs. La même situation survenait en 2007 sauf qu'à la rivière Noire, les concentrations n'étaient pas différentes de celles mesurées au lac Boivin. Finalement, pour l'ensemble des données, les niveaux sont plus élevés au lac Boivin que partout ailleurs sauf à Deborah Stairs. On peut donc voir que les tendances entre 2007 et 2008 sont quand même conservées même si les différences significatives varient

quelque peu. Au général, on peut encore une fois affirmer que les concentrations d'esters de rétinol sont très élevées au lac Boivin par rapport aux autres sites. Le lac Boivin est un milieu protégé où l'on retrouve un centre d'interprétation de la nature. On peut supposer que les ouaouarons ont de la nourriture en abondance à ce site, ce qui permet de faire d'importantes réserves de rétinoïdes au niveau du foie.

En 2007, on observait un ratio des esters de rétinol sur le rétinol hépatique plus faible à la rivière Noire pour l'ensemble des données. En 2008, aucune différence significative n'est observée pour aucun des groupes (fig. 3.9). Ces deux résultats semblent indiquer que l'enzyme HER qui transforme les esters de rétinol en rétinol dans le foie (Noy, 2000) n'est pas altérée par les contaminants agricoles. En effet, si c'était le cas nous retrouverions un ratio plus élevé au site de la rivière Noire puisque les esters de rétinol ne pouvant être transformés en rétinol augmenteraient par rapport au rétinol ce qui causerait une hausse du ratio. Au lac Boivin, on observe une telle situation en 2007. Par contre, on peut attribuer la hausse de ce ratio à une augmentation importante des esters de rétinol sans baisse simultanée du rétinol hépatique, ce qui pourrait plutôt indiquer une augmentation des réserves de rétinoïdes, les esters de rétinol étant la forme de stockage principale (Noy, 2000). Plusieurs études ont d'ailleurs été réalisées à savoir si les enzymes impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes étaient affectée par les contaminants de toutes sortes (Simms et Ross, 2000b). En effet, certaines études démontrent qu'une exposition à des BPC ou des dioxines en laboratoire provoque une altération du fonctionnement de l'enzyme ARAT qui transforme le rétinol en esters de rétinol (Nilsson *et al.*, 2000; Jensen *et al.*, 1987) et de l'enzyme HER impliquée dans le processus inverse (Ndayibagira et Spear, 1999; Jensen *et al.*, 1987). Dans la présente étude, le fonctionnement de HER ne semble pas affecté par l'activité agricole. Cela va à l'encontre de ce à quoi nous aurions pu nous attendre en fonction de la littérature. Cependant, les études précédentes ont été réalisées avec des BPC et des dioxines et non avec des contaminants agricoles ce qui peut expliquer la réponse différente qui a

été observée. En outre, celles-ci ont été réalisées chez des espèces différentes (rats et truites) et on peut facilement imaginer que la réponse peut être spécifique à l'espèce.

Alors qu'aucune différence significative n'était détectée pour le ratio rétinol plasmatique sur rétinol hépatique entre les sites en 2007, une différence est détectée pour les mâles en 2008 (fig. 3.10). En effet, ce ratio est plus faible au lac Boivin si on le compare avec celui obtenu pour les ouaouarons de la rivière Pot-au-Beurre. La situation au Lac Boivin s'explique par la très grande concentration de rétinol hépatique alors qu'inversement, elle peut s'expliquer par la faible concentration de rétinol hépatique à la rivière Pot-au-Beurre. La différence entre ces deux sites est donc explicable par une variation du rétinol hépatique et non par une variation du rétinol plasmatique. On peut penser que les réserves sont importantes au lac Boivin en raison de la riche alimentation alors qu'elles sont plus faibles à la rivière Pot-au-Beurre en raison de l'importante contamination industrielle de la région. Encore une fois, cette situation peut s'expliquer par de grandes concentrations de dééthyl-atrazine, d'atrazine et de métolachlore dans la rivière Pot-au-Beurre par rapport aux concentrations détectées au Lac Boivin (Tab. A.4).

En résumé, les résultats de 2008 sont quelque peu différents de ceux observés en 2007. En effet, bien que de plus faibles concentrations de rétinol plasmatique soient toujours observées à la rivière Noire, on observe également une diminution du rétinol et des esters de rétinol hépatique avec l'augmentation de l'intensité agricole. Cette situation pourrait alors être expliquée par un impact de l'activité agricole sur les enzymes responsables de la régulation des rétinoïdes hépatiques. On peut en effet penser que le stockage des rétinoïdes est effectué plus efficacement dans les sites de faible intensité agricole. Ce constat a d'ailleurs été rapporté pour les ouaouarons échantillonnés en 2004 (Boily *et al.*, 2009). Les faibles concentrations de rétinol plasmatique pourraient alors être la conséquence des faibles concentrations de rétinol hépatique, elle-même attribuable aux réserves d'esters de rétinol insuffisantes.

Cependant, cette hypothèse n'exclut pas que les protéines de transport soient également altérées par les contaminants d'origine agricole, diminuant d'autant plus les concentrations de rétinol plasmatique. Il ne faut pas non plus perdre de vue que d'autres facteurs environnementaux peuvent influencer les concentrations de rétinoïdes. En effet, comme ils proviennent de l'alimentation, une carence alimentaire peut également provoquer une chute de leurs concentrations. Cependant, les niveaux de phosphates et de nitrates élevés présents au site de forte intensité agricole favorisent la croissance de macrophytes et d'algues. Ainsi, la productivité primaire de ce site semble très bonne et on peut penser que les sources de rétinoïdes sont suffisantes même à la rivière Noire (Boily *et al.*, 2009).

4.4 Différence entre les sexes

Dans les deux sections précédentes, la réponse des mâles et des femelles a été comparée pour chacun des paramètres en fonction du gradient agricole. Cependant, il est aussi intéressant de comparer les concentrations des différents rétinoïdes entre les mâles et les femelles en général. En effet, bien que certaines études aient été effectuées pour déterminer l'impact des contaminants sur l'homéostasie des rétinoïdes (Bérubé *et al.*, 2005; Boily *et al.*, 2005; Besselink *et al.*, 1998; Branchaud *et al.*, 1993), très peu d'entre elles mettent en évidence les différences qu'il peut y avoir entre les mâles et les femelles. Bien qu'une différence significative apparaisse seulement au lac Boivin pour les esters de rétinol totaux en 2007 et pour le rétinol plasmatique et le ratio du rétinol plasmatique sur le rétinol hépatique en 2008 (Tab. 3.2), on peut observer visuellement que certains paramètres présentent des valeurs différentes pour les mâles et les femelles pour l'ensemble des sites. C'est ce que nous tenterons de faire ressortir dans cette section.

Les concentrations de rétinol plasmatique tendent à être plus élevées chez les femelles et ce pour les années 2007 et 2008 (fig 3.1 et 3.6). L'échantillonnage des

ouaouarons a lieu en pleine période de reproduction. Or, il se peut que certaines des femelles capturées aient été en processus d'ovogénèse. Cette situation provoque une hausse des demandes en rétinol puisque celui-ci est essentiel à la croissance, la différenciation cellulaire et le développement des œufs. Cependant, bien que les besoins en rétinol augmentent, les réserves suffisent habituellement à la combler (Olson, 1987). On peut donc supposer qu'une hausse des concentrations de rétinol dans le plasma sera accompagnée d'une baisse des réserves dans le foie. On observe d'ailleurs visuellement sur les figures 3.2 et 3.7 que les femelles possèdent en général de plus faibles concentrations de rétinol hépatique (situation qui semble plus évidente pour les ouaouarons échantillonnés en 2007). Cela suggère donc que les femelles puisent dans leurs réserves afin de fournir un apport adéquat en rétinol au fœtus. On pourrait également s'attendre à voir des concentrations d'esters de rétinol plus faibles chez les femelles que chez les mâles. C'est en effet ce qui peut être observé sur la figure 3.8 pour les grenouilles capturées en 2008. Pour les grenouilles échantillonnées en 2007 (fig. 3.3), la différence n'apparaît cependant pas aussi clairement. Le fait que la différence soit moins grande entre les mâles et les femelles pourrait s'expliquer par de plus grandes réserves chez les femelles avant la gestation en 2007. Si on observe le ratio esters de rétinol sur rétinol hépatique en 2007 (fig. 3.4), cette explication tient toujours la route. En effet, pour les grenouilles capturées en 2007, ce ratio paraît en général plus élevé chez les femelles que chez les mâles. Ainsi, il est possible que les concentrations initiales d'esters de rétinol aient été si élevées que, même si une certaine partie des esters est convertie en rétinol qui est ensuite secrété dans la circulation sanguine, le niveau des esters de rétinol demeure tout de même élevé. Comme le rétinol hépatique est en fait un intermédiaire entre le stockage hépatique (esters de rétinol) et le transport plasmatique (rétinol plasmatique), on peut penser que les concentrations de cette molécule dans le foie sont très faibles dans les périodes où la demande est grande. Finalement, en regardant le ratio du rétinol plasmatique sur le rétinol hépatique, il n'est pas surprenant de constater que le ratio semble, en général, nettement plus élevé chez les femelles et ce pour les deux années (fig. 3.5 et fig.

3.10). Cette situation s'explique autant par l'augmentation de rétinol plasmatique que par la baisse de rétinol hépatique chez les femelles en mesure de pondre des œufs.

Pour les humains, on rapporte souvent une baisse de rétinol plasmatique chez des femmes enceintes. En effet, dans une étude réalisée chez des femmes menant à terme une grossesse normale, les niveaux de rétinol détectés dans le plasma ont diminué, mais seulement à partir du troisième trimestre de la grossesse (Oostenbrug *et al.*, 1998). Chez des rats de laboratoire, il a aussi été démontré que les concentrations de rétinol dans le plasma des femelles déclinaient ponctuellement lors de la période d'organogénèse chez l'embryon (Satre *et al.*, 1992). Malgré tout, les chercheurs en viennent à la conclusion que les mesures des concentrations en rétinol dans le plasma pendant la grossesse ne sont pas concluantes (Oostenbrug *et al.*, 1998; Morse *et al.*, 1975). Dans l'étude de Morse *et al.* (1975), on démontre notamment que des femmes enceintes de douze semaines ne présentent pas de baisse en ce qui concerne les concentrations de rétinol plasmatique. Une autre étude réalisée par Panth *et al.* (1990) démontre que les femmes, à la mi-grossesse, présentent une augmentation des concentrations de rétinol plasmatique. Ces résultats démontrent qu'il n'y a pas consensus quant aux niveaux de rétinol dans le plasma des femmes et des mammifères en gestation. On peut comprendre, de ces résultats, que la mesure du rétinol plasmatique est ponctuelle et représente un état temporaire des niveaux de rétinol et que ceux-ci peuvent varier selon le stade de la grossesse.

En résumé, les résultats présentés dans les figures 3.1 à 3.10 tendent à démontrer que chez les ouaouarons femelles, les concentrations d'esters de rétinol pourraient être plus faibles que chez les mâles. Comme la demande est élevée pour supporter le développement de l'embryon, les esters seraient convertis en rétinol qui serait immédiatement sécrété dans la circulation sanguine, d'où de très faibles

concentrations de rétinoïdes hépatiques et une forte concentration ponctuelle de rétinol plasmatique.

4.5 Résultats LMC 2007 et 2008

La LMC a été utilisée afin de comparer la taille des ouaouarons en fonction des sites. Les différences significatives n'apparaissent que chez les mâles des deux années (Tab. 3.3). En 2007, la LMC des mâles de Deborah Stairs est la plus petite alors qu'en 2008 c'est à la rivière Yamaska que l'on retrouve les plus petits mâles en terme de LMC. Les ouaouarons du site de la rivière Noire présentent cependant des valeurs de LMC qui sont toujours parmi les plus faibles. Des analyses sur d'autres paramètres morphométriques ont été effectuées et un impact du gradient agricole n'était jamais dénoté de façon significative (résultats non présentés). Cette situation diffère quelque peu des résultats obtenus pour les ouaouarons échantillonnés en 2004 et 2005 où on a relevé une plus faible croissance en général chez les individus provenant de sites de forte intensité agricole. Malgré tout, dans cette dernière étude, c'est à la rivière Yamaska que l'on retrouvait la plus petite LMC, tout comme pour les ouaouarons de 2008 (Spear *et al.*, 2009). En outre, en 2007, c'est à la rivière Pot-au-Beurre que l'on retrouve les plus grandes LMC. Cette situation est similaire à celle observée en 2004 et en 2005 par Spear *et al.* (2009) puisque la LMC était aussi parmi les plus élevées à la rivière Pot-au-Beurre. D'autres études démontrent également un impact de divers contaminants sur la croissance des organismes exposés. Ainsi, une étude effectuée en mésocosme sur des têtards de l'espèce de grenouille *Rana luteiventris* a relevé un impact de différents métaux (plombs, cadmium et zinc) sur la longueur et le poids (Lefcort *et al.*, 1998). La LMC n'était pas affectée par une exposition à des métaux dans cette étude. Une autre étude a établi que des têtards de grenouilles léopards du sud (*Rana sphenoccephala*) exposées en laboratoire à des concentrations de 0,16 mg/L à 1 mg/L de carbaryl possèdent une masse plus faible que les têtards non exposés (Bridges, 2000). Il serait donc intéressant d'approfondir

davantage sur l'impact de la croissance, mais cela s'avère extrêmement complexe puisque les effets dépendent du type de contaminant, des niveaux d'exposition et du stade pendant lequel la grenouille a été exposée.

4.6 Résultats ratio poids du foie sur LMC 2007 et 2008

On peut comparer la figure du ratio poids du foie sur la LMC avec les figures de chacun des autres paramètres. Le but de cet exercice est de voir si le ratio poids du foie sur la LMC peut influencer chacun de ces paramètres. En effet, il pourrait être possible qu'un paramètre soit influencé par ce ratio plutôt que par le gradient agricole ou encore, qu'il soit influencé par les deux facteurs.

Si on commence par les résultats de 2007, on peut remarquer que, pour les mâles, le site de la rivière Pot-au-Beurre présente un ratio poids du foie sur LMC plus élevé qu'à tous les autres sites (fig. 3.11). Lorsqu'on observe le graphique du rétinol plasmatique pour la même année (fig. 3.1), on n'observe pas de différence significative, chez les mâles, entre le site de la rivière Pot-au-Beurre et les sites de Deborah Stairs, du Lac Boivin, du réservoir Choinière et de la rivière Yamaska. Il est donc peu probable que le ratio poids du foie sur LMC influence les concentrations de rétinol plasmatique. Pour le rétinol hépatique, la figure 3.2 démontre qu'il n'y a pas concordance entre ce paramètre et le ratio poids du foie sur LMC chez les mâles. Chez les femelles, les graphiques correspondent (sauf à la rivière Yamaska) et une influence pourrait être possible. En ce qui concerne les esters de rétinol hépatiques totaux (fig. 3.3), il est clair qu'il n'y a aucune influence possible entre les deux graphiques chez les mâles. Chez les femelles, les deux graphiques ne correspondent pas très bien et il est peu susceptible d'y avoir une influence. Pour le ratio des esters totaux sur le rétinol hépatique (fig. 3.4), les graphiques ne correspondent pas du tout chez les mâles et l'influence est très peu probable. Par contre, chez les femelles, les graphiques correspondent presque parfaitement et on pourrait supposer une influence du ratio poids du foie/LMC sur le ratio des esters de rétinol totaux/rétinol

plasmatique. Finalement, pour le ratio du rétinol plasmatique sur le rétinol hépatique (Fig. 3.5), les graphiques ne correspondent pas très bien puisqu'il n'y a aucune différence significative pour le ratio du rétinol plasmatique sur rétinol hépatique. Chez les femelles, une influence est possible puisqu'il n'y a pas de différence significative pour l'un ou l'autre des ratios et que les deux figures sont assez semblables. De façon globale pour 2007, on peut voir que le ratio poids du foie sur LMC ne semble pas influencer aucun paramètre pour les mâles. Chez les femelles, il est plus difficile d'évaluer s'il y a une influence car il n'y a pas de différences significatives entre les sites pour le ratio poids du foie sur LMC, mais une influence de ce ratio pourrait être possible sur chacun des paramètres.

Pour l'année 2008, la seule différence significative pour le ratio poids du foie sur LMC est observable pour les femelles alors que le ratio est plus élevé aux sites de la rivière Pot-au-Beurre et de la rivière Noire par rapport au site de Deborah Stairs (fig. 3.12). Les ratios pour les mâles sont très semblables entre les sites. Chez les femelles, le rétinol plasmatique (fig. 3.6), le rétinol hépatique (fig. 3.7) et le ratio des esters totaux sur le rétinol hépatique (fig. 3.8) semblent tous influencés par le ratio poids du foie sur LMC. En effet, alors que le ratio poids du foie sur LMC augmente en fonction du gradient agricole, les valeurs de ces paramètres diminuent en fonction de l'intensité agricole. Cependant, il faut noter que pour le rétinol plasmatique et le rétinol hépatique, les différences ne sont pas significatives entre les sites. Une influence semble également exister entre le ratio du rétinol plasmatique sur le rétinol hépatique (fig. 3.10) et le ratio du poids du foie sur la LMC chez les femelles. Cependant, la différence entre les sites n'est, encore une fois, pas significative pour le ratio rétinol plasmatique sur rétinol hépatique. Chez les mâles, aucune correspondance n'a pu être établie.

En résumé, on peut voir que le ratio poids du foie sur la LMC semble influencer l'homéostasie des rétinoïdes beaucoup plus chez les femelles que chez les

mâles. Comme les différences concernant la LMC ne sont pas significatives entre les sites (tab. 3.3), on peut supposer que le poids du foie influence l'homéostasie de certaines formes de rétinoïdes chez les femelles. Cela pourrait s'avérer extrêmement important puisque les femelles sont susceptibles d'avoir un foie plus gros que les mâles puisque l'échantillonnage a lieu en période d'ovogénèse. Or, on sait que pendant l'ovogénèse les concentrations des différentes formes de rétinoïdes peuvent être altérées comme discuté dans la section 4.4.

Une étude effectuée avec des rats de laboratoire démontre que lorsque l'on administre un agoniste du récepteur X des rétinoïdes, on observe une augmentation du poids du foie (Claudel *et al.*, 2001). Une étude de laboratoire effectuée avec quatre espèces différentes de rongeurs (rat, souris, hamster et cochon d'Inde) démontre qu'une exposition au TCDD à des concentrations variant de 2,5 à 1000 µg/kg provoque simultanément une augmentation du poids du foie et une baisse de la vitamine A dans le foie avec l'augmentation de la dose, et ce, pour les quatre espèces (Fletcher *et al.*, 2001). Cette étude démontre clairement qu'il peut y avoir interrelation entre contamination du milieu, poids du foie et homéostasie des rétinoïdes. Il aurait été intéressant de vérifier s'il y avait vraiment des corrélations entre les différents paramètres chez les femelles, mais un manque d'effectif empêchait de réaliser de telles analyses.

CONCLUSION

L'homéostasie des rétinoïdes est un phénomène très complexe dans lequel interviennent plusieurs enzymes et protéines de transport afin de maintenir à des concentrations très précises les différentes formes de rétinoïdes (Noy, 2000). Des études récentes ont démontré que le métabolisme de ce groupe de molécules pouvait être affecté, chez le ouaouaron, par la contamination d'origine agricole (Leiva-Presa *et al.*, 2006; Bérubé *et al.*, 2005; Boily *et al.*, 2005;).

Les premiers objectifs de cette étude étaient de confirmer certains résultats déjà obtenus et qui démontraient une baisse du rétinol plasmatique (Boily *et al.*, 2009; Bérubé *et al.*, 2005) ainsi qu'une baisse du ratio des esters de rétinol sur le rétinol hépatique (Boily *et al.*, 2009) chez les ouaouarons provenant de régions fortement agricoles. En outre, comme ces analyses ont été réalisées chez les mâles seulement, un deuxième objectif était de comparer la réponse chez les mâles et les femelles. De plus, il importait de vérifier la stabilité des résultats entre deux années d'échantillonnage consécutives. Finalement, comme les résultats préliminaires semblaient indiquer un problème au niveau du transport plasmatique du rétinol, un autre objectif de l'étude consistait à vérifier si la contamination agricole pourrait affecter les protéines impliquées dans le transport du rétinol dans le sang, c'est-à-dire la RBP et la TTR.

Les résultats obtenus dans cette étude, bien que variables selon le sexe et l'année suivent une certaine tendance. Ainsi, on remarque une diminution du rétinol plasmatique chez les mâles provenant du site où l'agriculture est intensive. Cette baisse n'est pas accompagnée d'une baisse concomitante du rétinol hépatique pour les ouaouarons de 2007. Chez les ouaouarons de 2008, on observe une baisse du rétinol hépatique, mais seulement en fonction de l'un des sites de plus faible intensité agricole. Le ratio des esters de rétinol sur le rétinol hépatique étant normal pour tous

les sites, on peut supposer que l'enzyme HER fonctionne bien et convertit les esters de rétinol en rétinol. Ces résultats nous amènent à penser qu'il pourrait y avoir un problème de transport du rétinol dans le plasma.

Bien que plusieurs études se soient concentrées sur l'impact des contaminants sur les enzymes impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes (Boily *et al.*, 2009), très peu ont été réalisées sur le transport du rétinol dans le sang. Nous avons d'abord tenté de doser les concentrations plasmatiques de TTR et de RBP à chacun des sites avec peu de succès. La méthode de dosage n'a pas permis d'isoler clairement les deux protéines du plasma malgré nos efforts pour la mettre au point. Un pic inconnu apparaissait sur le chromatogramme du standard de RBP. Il est possible que les deux pics obtenus soit, en fait, des sous-unités de la même protéine. Il serait dès lors intéressant de vérifier nos résultats avec un chromatogramme du standard provenant de la compagnie. Puisque les IgG et l'albumine possèdent un poids moléculaire similaire à celui du complexe rétinol-RBP-TTR, il est possible que la présence de ses molécules camoufle le complexe et rende sa détection difficile au HPLC. Il serait donc intéressant d'utiliser une méthode permettant de retirer l'albumine et les IgG de nos échantillons avant de les analyser. Ainsi, plusieurs techniques ayant été testées efficacement dans d'autres études permettraient d'éliminer ces protéines. Pour ce faire, il est possible d'utiliser une colonne possédant une résine avec des anticorps pour les IgG et l'albumine. En faisant passer l'échantillon dans une telle colonne, les molécules d'IgG et d'albumine sont retirées de l'échantillon (Raghu *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2003). Une de ces colonnes est appelée Cibacron Blue-Sepharose et elle permet de retirer approximativement 98 % des molécules d'albumine (Travis *et al.*, 1976). D'autres méthodes utilisent aussi d'autres types de résines ou une combinaison de résines (Steel *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 1995). Par exemple, Steel *et al.*, (2003) ont développé une méthode qui permet d'éliminer l'albumine du plasma en une seule étape en utilisant en combinaison une résine avec des protéines G et une résine qu'ils ont synthétisée en laboratoire en produisant leurs propres anticorps

monoclonaux. Pour sa part, la protéine A, une protéine de la paroi cellulaire de *Staphylococcus aureus*, possède une forte affinité pour la portion Fc des molécules d'IgG et retire ainsi efficacement ces molécules du plasma (Ankerst *et al.*, 1974). Johnson et Libby (1980) ont, de leur côté, utilisé la chromatographie en échange d'ions pour éliminer environ 95 % des IgG du plasma. Suite à la purification du plasma par une ou plusieurs de ces méthodes, il suffit de faire passer la solution récoltée dans la colonne du HPLC pour obtenir des chromatogrammes où l'albumine et les IgG ont été majoritairement exclues.

Finalement, nous avons essayé de mesurer le taux de synthèse de ces protéines dans le foie. Pour ce faire, nous avons tenté de quantifier l'ARNm de ces protéines dans les tissus hépatiques. Cette quantification s'est avérée infructueuse en raison de la difficulté à isoler l'ARNm de ces protéines dans ce tissu. Il s'agit par contre d'une voie très prometteuse pour l'avenir qui mérite d'avantage d'investigation. Finalement, cette étude démontre, principalement chez les femelles, qu'il peut y avoir interrelation entre contamination du milieu, poids du foie et homéostasie des rétinoïdes.

En ce qui concerne le suivi du métabolisme des rétinoïdes, certaines précisions seraient intéressantes à apporter afin d'obtenir des informations supplémentaires. Par exemple, puisque les esters de rétinol sont transportés des hépatocytes vers les cellules étoilées lors du stockage (Noy, 2000), il aurait été intéressant de vérifier les pourcentages de chacune de ces cellules avant d'analyser le tissu. Des études ultérieures seraient donc nécessaires afin de voir si des augmentations ou des diminutions des concentrations en esters de rétinol hépatiques pourraient s'expliquer par une non homogénéité du tissu analysé. On pourrait aussi prendre plusieurs portions différentes du foie et comparer les résultats obtenus afin de voir s'ils sont constants. En outre, il serait intéressant de connaître l'âge exact des ouaouarons analysés pour évaluer les corrélations entre l'âge et les concentrations en différents rétinoïdes. Des projets sont d'ailleurs en cours dans notre laboratoire afin

de déterminer l'âge des ouaouarons à partir des cercles de croissances de leurs os, discipline nommée squelettechronologie (Spear et al., 2009; Halliday et Verrell, 1988; Daugherty et Sheldon, 1982). De plus, il serait intéressant d'établir un nouveau site de forte intensité agricole. En effet, jusqu'en 2005, le site de la rivière à la Barbue nous procurait des informations supplémentaires en nous fournissant d'autres ouaouarons provenant d'un site de forte intensité agricole. Cependant, au cours des dernières années, il a été impossible de trouver suffisamment de ouaouarons provenant de ce site. Il est possible que le site soit tellement contaminé que les ouaouarons ne s'y reproduisent tout simplement plus. Il serait donc intéressant de rechercher un autre site de forte intensité agricole afin d'avoir des données provenant d'au moins deux sites différents.

Les résultats obtenus en ce qui concerne le métabolisme des rétinoïdes ont permis de confirmer la baisse de rétinol plasmatique chez les ouaouarons provenant des régions fortement agricoles. Il a été établi que cette baisse n'était pas associée à une diminution concomitante des réserves hépatiques. Les résultats ont donc donné plus de poids à l'hypothèse selon laquelle les contaminants agricoles affectent directement les protéines de transport des rétinoïdes. Bien que les résultats concernant le dosage de ces protéines n'aient pas été concluants, cette étude a tout de même permis de faire des progrès importants pour la mise au point de techniques de mesure de ces protéines dans le plasma et de l'évaluation de leur taux de synthèse dans le foie.

RÉFÉRENCES

- Amano, T., Noro, N., Kawabata, H., Kobayashi, Y. et Yoshizato, K. 1998. Metamorphosis-associated and region-specific expression of calbindin gene in the posterior intestinal epithelium of *Xenopus laevis* larva. *Dev. Growth. Differ.* 40: 177-188.
- Ankerst, J., Christensen, P., Kjellén, L. et Kronvall, G. 1974. A routine diagnostic test for IgA and IgM antibodies to rubella virus: absorption of IgG with *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 130 (3): 268-273.
- Arcand-Hoy, L.D. et Metcalfe, C.D. 1999. Biomarkers of exposure of brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) to contaminants in the lower Great Lakes, North America. *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (4): 740-749.
- Bahar, B., Monahan, F.J., Moloney, A.P., Schmidt, O., MacHugh, D.E. et Sweeney, T. 2007. Long-term stability of RNA in post-mortem bovine skeletal muscle, liver, and subcutaneous adipose tissues. *BMC Mol. Biol.* 8: 108-120.
- Barinaga, M. 1990. Where have all the froggies gone? *Science* 247: 1033-1034.
- Barua, A.B. et Furr, H.C. 1998. Properties of retinoids: Structure, Handling and Preparation. In *Methods in Molecular Biology: Retinoid protocols*. C. P. F. Redfern. Totowa, NJ. 434 pp.
- Beckmen, K.B., Lowenstine, L.J., Newman, J., Hill, J., Hanni, K. et Gerber, J. 1997. Clinical and pathological characterization of northern elephant seal skin disease. *J. Wildlife Dis.* 33: 438-449.
- Beebee, T.J.C. et Griffiths, R.A. 2005. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biol. Conserv.* 125: 271-285.
- Bérubé, V.E., Boily, M.H., DeBlois, C., Dassylva, N. et Spear, P.A. 2005. Plasma retinoid profile in bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural intensity of sub-watersheds in the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada. *Aquat. Toxicol.* 71: 109-120.
- Berryman, D. et Giroux, I. 1994. La contamination des cours d'eau par les pesticides dans les régions de culture intensive de maïs au Québec, Ste-Foy, Québec, Canada: Ministère de l'Environnement et de la Faune. Direction des écosystèmes aquatiques. Envirodoq # ENV940594. 133 pp.

Berryman, D., Houde, F., Deblois, C. et O'Shea, M. 2003. Suivi des nonylphénols éthoxylés dans l'eau brute et l'eau traitée de onze stations de traitement d'eau potable au Québec: Direction du suivi de l'état de l'environnement, Ministère de l'environnement, Québec. Envirodoq # ENV/2003/0001. 32 pp.

Besselink, H.T., Flipsen, E.M.T.E., Eggens, M.L., Vethaak, A.D., Koeman, J.H. et Brouwer, A. 1998. Alterations in plasma and hepatic retinoid levels in flounder (*Platichthys flesus*) after chronic exposure to contaminated harbour sludge in a mesocosm study. *Aquat. Toxicol.* 42: 271-285.

Blaner, W.S. 1989. Retinoid-binding protein: The serum transport protein for vitamin A. *Endocr. Rev.* 10: 308-316.

Blaustein, A.R. et Kiesecker, J.M. 2002. Complexity in conservation: Lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecol. Lett.* 5: 597-608.

Blaustein, A.R., Kiesecker, J.M., Chivers, D.P., Grant Hokit, D., Marco, A., Belden, L.K. et Hatch, A. 1998. Effects of ultraviolet radiation on amphibians: Field experiments. *Am. Zool.* 38: 799-812.

Blaustein, A.R., Wake, D.B. et Sousa, W. 1994. Amphibian declines: Judging the stability, persistence, and susceptibility of local populations to local and global extinction. *Conserv. Biol.* 8: 60-71.

Blomhoff, R., Green, M.H., Balmer Green, J., Berg, T. et Norum, K.R. 1991. Vitamin A metabolism: New perspectives on absorption, transport and storage. *Physiol. Rev.* 71: 950-991.

Blomhoff, R., Green, M.H., Berg, T. et Norum, K.R. 1990. Transport and storage of vitamin A. *Science.* 250: 399-404.

Boily, M.H., Bérubé, V.E., Spear, P.A., DeBlois, C. et Dassylva, N. 2005. Hepatic retinoids of bullfrogs in relation to agricultural pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 1099-1106.

Boily, M.H., Bisson, M. et Spear, P.A. 2004. Rétinoïdes: biomarqueurs et base moléculaire d'effets de substances toxiques. In *Écotoxicologie moléculaire, principes fondamentaux et perspectives de développement*, éd. par G. C. Campbell, Denizeau, F. et Pelletier, E. Ste-Foy, Québec, Canada. 462 pp.

Boily, M.H., Champoux, L., Bourbonnais, D.H., DesGranges, J.H., Rodrigue, J. et Spear, P.A. 1994. β -carotene and retinoids in eggs of Great Blue Herons (*Ardea Herodias*) in relation to St. Lawrence River contamination. *Ecotoxicol.* 3: 271-286.

Boily, M.H., Thibodeau, J. et Bisson, M. 2009. Retinoid metabolism (LRAT, REH) in the liver and plasma retinoid of bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural contamination. *Aquat. Toxicol.* 91: 118-125.

Bolognesi, C. 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. res.* 543: 251-272.

Boone, M.D. et James, S.M. 2003. Interactions of an insecticide, herbicide, and natural stressors in amphibian community mesocosms. *Ecol. Appl.* 13: 829-841.

Borst, A., Box, A.T.A. et Fluit, A.C. 2004. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 23: 289-299.

Boyd, C.A., Weiler, M.H. et Porter, W.P. 1990. Behavioral and neurochemical changes associated with chronic exposure to low-level concentration of pesticide mixtures. *J. Toxicol. Env. Health* 30: 209-221.

Boyer, P.M., Ndayibagira, A. et Spear, P.A. 2000. Dose-dependent stimulation of hepatic retinoic acid hydroxylation/oxidation and glucuronidation in brook trout, *Salvelinus fontinalis*, after exposure to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 700-705.

Branchaud, A., Spear, P.D., Gendron, A.D., Fortin, R. et Anderson, P.D. 1993. Vitamin A (retinoids), malformations and contamination in white suckers and lake sturgeon around Montreal island. *14th Annual meeting (SETAC): Ecological risk assessment: Lessons learned?*

Bridges, C.M. 2000. Long-term effects of pesticides exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39: 91-96.

Brouwer, A., Reijnders, P.J.H. et Koeman, J.H. 1989. Polychlorinated biphenyl (PCB)-contaminated fish induces vitamin A and thyroid hormone deficiency in the common seal (*Phoca vitulina*). *Aquat. Toxicol.* 15: 99-106.

Brouwer, A. et van den Berg, K.J. 1986. Binding of a metabolite of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl to transthyretin reduces serum vitamin A transport by inhibiting the formation of the protein complex carrying both retinol and thyroxin. *Toxicol. Appl. Pharm.* 85: 301-312.

Brown Sullivan, K. et Spence, K.M. 2003. Effects of sublethal concentrations of atrazine and nitrate on metamorphosis of the african clawed frog. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 627-635.

Bruneau, M. et Magnin, E. 1980. Croissance, nutrition et reproduction des ouaouarons *Rana catesbeiana* Shaw (Amphibia anura) des Laurentides au nord de Montréal. *Can. J. Zoolog.* 58: 175-183.

Burri, B.J. et Kutnink, M.A. 1989. Liquid-chromatographic assay to free and transthyretin-bound retinol-binding protein in serum from normal humans. *Clin. Chem.* 35(4): 582-586.

Carmago, J.A., Alonso, A. et Salamanca, A. 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals : a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere.* 58: 1255-1267.

Carr, J. A., Gentles, A., Smith, E. E., Goleman, W. L., Urquidi, L. J., Thuett, K., Kendall, R. J., Giesy, J. P., Gross, T. S., Solomon, K. R., et Van Der Kraak, G. 2003. Response of larval *Xenopus laevis* to atrazine: Assessment of growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 396-405.

Chambon, P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10: 940-954.

Champoux, L., Rodrigue, J., Trudeau, S., Boily, M.H., Spear, P.A. et Hontela, A. 2006. Contamination and biomarkers in the Great Blue Heron, an indicator of the state of the St. Lawrence river. *Ecotoxicol.* 15: 83-96.

Chen, W.Y.J., James, H.O. et Glover, J. 1986. Retinol transport proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 14 (5): 925-928.

Christensen, E.I. et Birn, H. 2001. Megalin and cubulin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *J. Am. Soc. Nephrol.* 280: 562-573.

Christensen, E.I., Moskaug, J.O., Vorum, H., Jacobsen, C., Gundersen, T.E., Nykj, A., Blomhoff, R., Willnow, T.E. et Moestrup, S.K. 1999. Evidence for an essential role of megalin in transepithelial transport of retinol. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 685-695.

Christensen, E.I. et Willnow, T.E. 1999. Essential role of megalin in renal proximal tubule for vitamin homeostasis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 2224-2236.

Christin, M.C., Gendron, A.D., Brousseau, P., Ménard, L., Marcogliese, D.J., Cyr, D., Ruby, S et Fournier, M. 2003. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 1127-1133.

Claudel, T., Leibowitz, M.D., Fiévet, C., Tailleux, A., Wagner, B., Repa, J.J., Torpier, G., Lobacarro, J.-M., Paterniti, J., Mangelsdorf, D.J., Heyman, R.A. et Auwerx, J. 2001. Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor. *PNAS.* 98 (5): 2610-2615.

Coady, K.K., Murphy, M.B., Villeneuve, D.L., Hecker, M., Jones, P.D., Carr, J.A., Solomon, K.R., Smith, E.E., Van Der Kraak, G., Kendall, R.J. et Giesy, J.P. 2005. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity, and sex steroid concentrations in *Xenopus laevis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62:160-173.

Colborn, T.F., von Saal, F.S. et Soto, A.M. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101: 378-383.

Collins, J.P. et Storfer, A. 2003. Global amphibian declines: Sorting the hypotheses. *Divers. Distrib.* 9: 89-98.

Crump, M.L., Hensley, F. and Clark, K.L. 1992. Apparent decline of the golden toad: Underground or instinct? *Copeia.* 2: 413-420.

Daugherty, C.H. et Sheldon, A.L. 1982. Age-determination, growth and life history of a Montana population of the tailed frog (*Ascaphus truei*). *Herpetologica.* 38 (4): 461-468.

Delis, P.R., Mushinsky, H.R. et McCoy, E.D. 1996. Decline of some west-central Florida anuran populations in response to habitat degradation. *Biodivers. Conserv.* 5: 1579-1595.

Dickman, E.D., Thaller, C. et Smith, S.M. 1997. Temporally-regulated retinoic acid depletion produces specific neural crest, ocular and nervous system defects. *Development.* 124: 3111-3121.

- Doyon, C., Boileau, S., Fortin, R. et Spear, P.A. 1998. Rapid HPLC analysis of retinoids and dehydroretinoids stored in fish liver: Comparison of two lake sturgeon populations. *J. Fish Biol.* 53: 973-986.
- Eldridge, N. 1998. *Life in the balance: Humanity and the biodiversity crisis*. Princeton, NJ: Princeton University press. 240 pp.
- Episkopou, V., Maeda, S., Nishiguchi, S., Shimada, K., Gottesman, M.E. et Robertson, E.J. 1993. Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasmaretinol and thyroid hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 2375-2379.
- Fahrig, L., Pedlar, J.H., Pope, S.E., Taylor, P.D. et Wegner, J.F. 1995. Effect of road traffic on amphibian density. *Biol. Conserv.* 73: 177-182.
- Fellers, G.M., McConnell, L.L., Pratt, D. et Datta, S. 2004. Pesticides in mountain Yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) from the Sierra Nevada mountains of California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2170-2177.
- Fletcher, N., Hanberg, A. et Hakansson, H. 2001. Hepatic vitamin A depletion is a sensitive marker of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) exposure in four rodent species. *Toxicol. Sci.* 62: 166-175.
- Frank, G. et Sirons, R. 1979. Atrazine: its use in corn production and its loss to stream waters in southern Ontario. *Sci. Tot. Environ.* 12: 223-239.
- Freeman, W.M., Walker, S.J. et Vrana, K.E. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*. 26: 112-125.
- Fry, D.M. 1995. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environ. Health Perspect.* 103 (7): 165-171.
- Funkenstein, B. 2001. Developmental expression, tissue distribution and hormonal regulation of fish (*Sparus aurata*) serum retinol-binding protein. *Comp. Biochem. Phys. B.* 129: 613-622.
- Galloway, T. et Handy, R. 2003. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology*. 12: 345-363.
- Gamble, M.V., Ramakrishnan, R., Palafox, N.A., Briand, K., Berglund, L. et Blaner, W.S. 2001. Retinol-binding protein as a surrogate measure for serum retinol: Studies in vitamin A-deficient children from the republic of the Marshall islands. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 594-601.

- Gardner, T. 2001. Declining amphibian populations: A global phenomenon in conservation biology. *Animal Biodiv. Conserv.* 24: 1-20.
- Gendron, A.D., Marcogliese, D.J., Barbeau, S., Christin, M.S., Brousseau, P., Ruby, S., Cyr, D. et Fournier, M. 2003. Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. *Oecologia*. 135: 469-476.
- Giroux, I. 2004. La présence de pesticides dans l'eau en milieu agricole au Québec: Ministère de l'Environnement. Direction de l'état du suivi de l'environnement. Envirodoq # ENV/2004/0309. 40 pp.
- Giroux, I, Robert, C et Dassylva, N. 2006. Présence de pesticides dans l'eau au Québec: bilan dans des cours d'eau de zones en culture de maïs et de soya en 2002, 2003 et 2004 et dans les réseaux de distribution d'eau potable. Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs, envirodoq n° ENV/2006/013.
- Grasman, K.A., Fox, G.A., Scanlon, P.F. et Ludwig, J.P. 1996. Organochlorine-associated immunosuppression in pre fledging Caspian terns and Herring gulls from the Great Lakes: An ecoepidemiological study. *Environ. Health Perspect.* 104: 829-842.
- Green, M.H. et Green, J.B. 1994. Dynamics and control of plasma retinol. In *Vitamin A in health and disease*. R. Blomhoff. New York. 677 pp.
- Greenlee, A.R., Ellis, T.M. et Berg, R.L. 2004. Low-doses agrochemicals and lawn-care pesticides induce developmental toxicity in murine preimplantation embryos. *Environ. Health Perspect.* 112 (6): 703-709.
- Groppelli, S., Pennati, R., De Bernadi, F., Menegola, E., Giavini, E. et Sotgia C. 2005. Teratogenic effects of two antifungal triazoles, triadimefon and triadimenol, on *Xenopus laevis* development: Craniofacial defects. *Aquat. Toxicol.* 73: 370-381.
- Halliday, T.R. et Verrell, P.A. 1988. Body size and age in amphibians and reptiles. *J. Herpetol.* 22 (3): 253-265.
- Hayes, T.B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V.P., Marjuoa, Y., Parker, J. et Tsui, M. 2006. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact? *Environ. Health Perspect.* 114: 40-50.

Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A. et Vonk, A. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99: 5476-5480.

Hodam, J.R. et Creek, K.E. 1998. Comparison of the metabolism of retinol delivered to human keratinocytes either bound to serum retinol-binding protein or added directly to the culture medium. *Exp. Cell Res.* 238: 257-264.

Hofmann, C. et Eichele, G. 1994. Retinoids in development. In *Retinoids, Biology, Chemistry and Medicine*. M. B. Sporn, Roberts, A.B. and Goodman, D.S. New York. 679 pp.

Houlahan, J.E., Findlay, C.S., Schmidt, B.R., Meyer, A.H. et Kuzmin, S.L. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population decline. *Nature*. 412: 499-500.

Ingenbleek, Y. et Young, V. 1994. Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Ann. Rev. Nutr.* 14: 495-533.

Ishihara, A., Sawatsubashi, S. et Yamauchi, K. 2003. Endocrine disrupting chemicals: interference of thyroid hormone binding to transthyretins and thyroid hormone receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 199: 105-117.

Jaeger, J.W., Carlson, I.H. et Porter, W.P. 1999. Endocrine, immune, and behavioral effects of aldicarb (carbamate), atrazine (triazine) and nitrate (fertilizer) mixtures at groundwater concentrations. *Toxicol. Ind. Health*. 15:133-151.

Jensen, R.K., Cullum, M.E., Deyo, J. et Zile, M.H. 1987. Vitamin A metabolism in rats chronically treated with 3,3',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl. *Biochim. Biophys. Acta*. 926 (3): 310-320.

Johansson, M. Räsänen, K. et Merilä, L. 2001. Comparison of nitrate tolerance between different populations of the common frog, *Rana temporaria*. *Aquat. Toxicol.* 54: 1-14.

Johnson, R.B. et Libby, R. 1980. Separation of immunoglobulin M (IgM) essentially free of IgG from serum in systems requiring assay of IgM-type antibodies without interference from rheumatoid factor. *J. Clin. Microbiol.* 1: 132-135.

Kaplan, B.B., Bernstein, S.L. et Gioio, A.E. 1979. An improved method for the rapid isolation of brain ribonucleic acid. *Biochem. J.* 83: 181-184.

Kastner, P., Grondona, J.M., Mark, M., Gansmuller, A., Lemeur, M., Decimo, D., Vonesch, J.-L., Dollé, P. et Chambon, P. 1994. Genetic analysis of RXR α developmental function : convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell*. 78: 987-1003.

Kastner, P., Mark, M. et Chambon, P. 1995. Nonsteroid nuclear receptor: what are genetic studies telling us about their roles in real life? *Cell*. 83: 859-869.

Kastner, P., Mark, M., Leid, M., Gransmuller, A., Chin, W., Grondona, J.M., Decimo, D., Krezel, W., Dierech, A. et Chambon, P. 1996. Abnormal spermatogenesis in RXR β mutant mice. *Gen. Develop.* 10: 80-92.

Keshavan, R. et Deshmukh, P.B. 1984. Vitamin A concentrations in liver and serum of the frog, *Rana tigris*, treated with DDT and sevin. *Indian J. Comp. Anim. Physiol.* 2: 32-36.

Kiesecker, J.M. 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: A link to amphibian limb deformities in nature? *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99 (15): 9900-9904.

Kiesecker, J.M. et Blaustein, A.R. 1995. Synergism between UV-B radiation and a pathogen magnifies amphibian embryo mortality in nature. *PNAS USA*. 92: 11049-11052.

King, K.C., McLaughlin, J.D., Gendron, A.D., Pauli, B.D., Giroux, I., Rondeau, B., Boily, M., Juneau, P. et Marcogliese, D.J. 2007. Impacts of agriculture on the parasite communities of northern leopard frogs (*Rana pipiens*) in southern Quebec, Canada. *Parasitology*. 134: 2063-2080.

Knapp, R.A. et Matthews, K.R. 2000. Non-native fish introductions and the decline of the mountain yellow-legged frog from within protected areas. *Conserv. Biol.* 14: 428-438.

Kochendoerfer, G.G., Lin, S.W., Sakmar, T.P. et Mathies, R.A. 1999. How color visual pigments are tuned. *Trends Biochem. Sci.* 24: 300-305.

Lans, M.C., Wehler, E., Willemsen, M., Meussen, E., Safe, S.H. et Brouwer, A. 1993. Structure-dependant, competitive interaction of hydroxyl-polychlorobiphenyls. *Chem. Biol. Interact.* 88: 7-21.

- Lefcort, H., Meguire, R.A., Wilson, L.H. et Ettinger, W.F. 1998. Heavy metals alter the survival, growth, metamorphosis and antipredatory behavior of Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) tadpoles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 447-456.
- Leiva-Presa, A et Jenssen, B.M. 2006. Effect of *p,p'*-DDE on retinoid homeostasis and sex hormones of adult male european common frogs (*Rana temporaria*). *J. Toxicol. Environ. Health.* 69: 2051-2062.
- Leiva-Presa, A., Mortensen, A.S., Arukwe, A. et Jenssen, B.M. 2006. Altered hepatic retinol and CYP26 levels in adult European common frogs (*Rana temporaria*) exposed to *p,p'*-DDE. *Mar. Environ. Res.* 62: S10-S15.
- Lemaire, G., Balagner, P., Michel, S. et Rahmani, R. 2005. Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by organochlorine pesticides. *Toxicol. Appl. Pharm.* 202: 38-49.
- Letcher, R.J., Klasson-Wehler, E. et Bergman, A. 2000. Methyl sulfone and hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls. In: *Handbook of environmental chemistry- New types of persistent halogenated compounds*. (Paasivita, Ed). Heidelberg: Springer-Verlag. 379 pp.
- Levy, G., Lutz, I., Krüger, A., Tümpling, W.V. et Kloas W. 2004. Retinol-binding protein as a biomarker to assess endocrine-disrupting compounds in the environment. *Anal. Bioanal. Chem.* 378: 676-683.
- Lewis, W.M. et Morris, D.P. 1986. Toxicity of nitrite to fish: a review. *Trans. American Fish. Soc.* 115 (2): 183-195.
- Lips, K.R. 1998. Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conserv. Biol.* 12: 106-117.
- Liu, Z., Clay, S.A., Clay, D.E. et Harper, S.S. 1995. Ammonia fertilizer influences atrazine adsorption-desorption characteristics. *J. Agr. Food Chem.* 43: 815-819.
- Maden, M. 2000. The role of retinoic acid in embryonic and post-embryonic development. *P. Nutr. Soc.* 59: 65-73.
- Marco, A., Quilchano, C. et Blaustein, A.R. 1999. Sensitivity to nitrate and nitrite in pond-breeding amphibians from the pacific northwest, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (12): 2836-2839.
- Marieb, E.N. 1999. Anatomie et physiologie humaines. Saint-Laurent (Qc). *Éditions du renouveau pédagogique*. 1194 pp.

Martins, M.C.L., Naemi, E., Ratner, B.D. et Barbosa, M.A. 2003. Albumin adsorption on Cibacron Blue F3G-A immobilized onto oligo (ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers. *J. Mater. Sci.: Mat. In Med.* 14: 945-954.

Martins, T.B., Jaskowski, T.D., Mouritsen, C.L. et Hill, H.R. 1995. An evaluation of the effectiveness of three immunoglobulin G (IgG) removal procedures for routine IgM serological testing. *Clin. Diag. Lab. Immun.* 2 (3): 98-103.

Mangelsdorf, D., Umesono, K. et Evans, R.M. 1994. The retinoid receptors. In *The retinoids, Biology, Chemistry and Medicine*, edited by M. B. Sporn, Roberts, A.B. and Goodman, D.S. New York. 679 pp.

McCarty, J.P. 2001. Ecological consequences of recent climate change. *Conserv. Biol.* 15 (2): 320-331.

McKearin, D.M. et Shapiro, D.J. 1988. Persistent estrogen induction of hepatic *Xenopus laevis* serum retinol-binding protein mRNA. *J. Biol. Chem.* 263: 3261-3265.

Mendes Sousa, M., Norden, A.G.W., Jacobsen, C., Willnow, T.E., Christensen, E.I., Thakker, R.V., Verroust, P.J., Moestrup, S.K. et Saraiva, M.J. 2000. Evidence for the role of megalin in renal uptake of transthyretin. *J. Biol. Chem.* 275: 38176-38181.

Menegola, E., Marisa, B.L., Di Renzo, F., Massa, V. et Giavini, E. 2004. Relationship between hindbrain segmentation, neural crest cell migration and branchial arch abnormalities in rat embryos exposed to fluconazole and retinoic acid *in vitro*. *Reprod. Toxicol.* 18:121-130.

Monaco, H.L. 2000. The transthyretin-retinol-binding protein complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 1482: 65-72.

Morse, E.H., Clarke, R.P., Keyser, D.E., Merrow, S.B. et Bee, D.E. 1975. Comparison of the nutritional status of pregnant adolescents with adult pregnant women. I. Biochemical findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 28: 1000-1013.

Munro, H.N. 1986. Back to basics: an evolutionary odyssey with reflections on the nutrition research of tomorrow. *Annu. Rev. Nutr.* 6: 1-13.

Murk, A.J., Boudewijn, T.J., Meininger, P.L., Bosweld, A.T.C., Rossaert, G., Ysebaert, T., Meire, P. et Dirksen, S. 1996. Effects of polyhalogenated aromatic hydrocarbons and related contaminants on common tern reproduction: Integration of biological, biochemical, and chemical data. *Arch. Environ. Con. Tox.* 31: 128-140.

Muto, Y., Smith, J.E., Milch, P.O. et Goodman, D.S. 1972. Regulation of retinol-binding protein metabolism by vitamin A status in the rat. *J. Biol. Chem.* 247: 2542-2550.

Napoli, J.L. 1996. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *The FASEB journal* 10: 993-1001.

Napoli, J.L. 1999. Interactions of retinoid-binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1440:139-162.

Ndayibagira, A. et Spear, P.A. 1999. Esterification and hydrolysis of vitamin A in the liver of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the influence of coplanar polychlorinated biphenyl. *Comp. Biochem. Phys. C.* 122: 317-325.

Newcomer, M.E. et Ong, D.E. 2000. Plasma retinol-binding protein: Structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1482: 57-64.

Niederreither, K., Subbarayan, V., Dolle, P. et Chambon, P. 1999. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat. Genet.* 21: 444-448.

Nilsson, C.B., Hoegberg, P., Trossvik, C., Azais-Braesco, V., Blaner, W.S., Fex, G., Harrison, E.H., Nau, H., Schmidt, C.K., Van Bennekum et Hakansson, H. 2000. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin increases serum and kidney retinoic acid levels and kidney retinol esterification in the rat. *Toxicol. Appl. Pharm.* 169: 121-131.

Noy, N. 2000. Retinoid-binding proteins: Mediators of retinoid action. *Biochem. J.* 348: 481-495.

Olson, J.A. 1986. Metabolism of vitamin A. In *Biological roles of retinol and other retinoids*. Liverpool: Biochemical Society Transaction.

Olson, J.A. 1987. Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin A in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 704-716.

Oostenbrug, G.S., Mensik, R.P., Al, M.D.L., van Houwelingen, A.C. et Hornstra, G. 1998. Maternal and neonatal plasma antioxidant levels in normal pregnancy, and the relationship with fatty acid unsaturation. *Brit. J. Nutr.* 80: 67-73.

Orton, F., Carr, J.A. et Handy, R.D. 2006. Effects of nitrate and atrazine on larval development and sexual differentiation in the northern leopard frog *Rana pipiens*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 65-71.

Ouellet, M., Bonin, J., Rodrigue, J. DesGranges, J.L. et Lair, S. 1997. Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *J. Wildlife Dis.* 33: 95-104.

Panth, M., Shatrugna, V., Yasodhara, P. et Sivakumar, B. 1990. Effect of vitamin A supplementation on haemoglobin and vitamin A levels during pregnancy. *Brit. J. Nutr.* 64: 351-358.

Pollard, T.D. et Earnshaw, W.C. 2004. *Biologie Cellulaire*. Elsevier science. USA. 853 pp.

Porter, W.P., Green, S.M., Debbink, N.L. et Carlson, I. 1993. Groundwater pesticides: Interactive effects of low concentrations of carbamates aldicarb and methomyl and the triazine metribuzin on thyroxine and somatropin levels in white rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 40: 15-34.

Power, D.M., Elias, N.P., Richardson, S.J., Mendes, J., Soares, C.M. et Santos, C.R.A. 2000. Evolution of the thyroid hormone-binding protein, transthyretin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119: 241-255.

Prapunpoj, P., Yamauchi, K., Nishiyama, N., Richardson, S.J. et Schreiber, G. 2000. Evolution of structure, ontogeny of gene expression, and function of *Xenopus laevis* transthyretin. *Am. J. Physiol. Reg. I.* 279: R2026-R2041.

Primeau, S., La Violette, N., St-Onge, J. et Berryman, D. 1999. Le bassin de la rivière Yamaska: profil géographique, sources de pollution et interventions d'assainissement, section 1. In : Le bassin de la rivière Yamaska: l'état de l'écosystème aquatique, ministère de l'Environnement du Québec, envirodoq no ENV990224, rapport no EA-14.

Quadro, L., Blaner, W.S., Salchow, D.J., Vogel, S., Piantedosi, R., Gouras, P., Freeman, S., Cosma, M.P., Colantuoni, V. et Gottesman, M.E. 1999. Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *The EMBO journal* 18: 4633-4644.

Raghu, P., Ravinder, P. et Sivakumar, B. 2003. A new method for purification of human plasma retinol-binding protein and transthyretin. *Biotechnol. Appl. Bioc.* 38: 19-24.

Reeder, A.L., Foley, G.L., Nichols, D.K., Hansen, L.G., Wikoff, B., Faeh, S., Eisold, J., Wheeler, M.B., Warner, R., Murphy, J.E. et Beasley, V.R. 1998. Forms and prevalence of intersexuality and effects of environmental contaminants on sexuality in Cricket frogs (*Acris crepitans*). *Environ. Health Persp.* 106 (5): 261-266.

Relyea, R.A. 2004. Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (7): 1737-1742.

Robbins, J. 1996. Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. In *Werner and Ingbar's: The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. C. Werner, Ingbar, S.H., Braverman, L.E. et Utiger, R.D. Philadelphia. 1100 pp.

Rolland, R.M. 2000. A review of chemically induced alterations in thyroid and vitamin A status from field studies of Wildlife and fish. *J. Wildlife Dis.* 36:615-635.

Ross, C.A. et Hammerling, U.G. 1994. Retinoids and the immune system. In *Retinoids, Biology, Chemistry and Medicine*. M. B. Sporn, Roberts, A.B. et Goodman, D.S. New York. 679 pp.

Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C. et De Luca, L.M. 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* 80: 1021-1054.

Saari, J.C. 1994. Retinoids in photosensitive systems. In *Retinoids, Biology, Chemistry and Medicine*. M. B. Sporn, Roberts, A.B. et Goodman, D.S. New York. 679 pp.

Sandoval, J., Rodriguez, J.L., Tur, G., Serviddio, G., Pereda, J., Boukaba, A., Sastre, J., Torres, L., Franco, L. et Lopez-Rodas, G. 2004. RNAPol-ChIP: a novel application of chromatin immunoprecipitation to the analysis of real-time gene transcription. *Nucleic Acids Res.* 32 (11): e88-e95.

Satre, M.A., Ugen, K.E. et Kochhar, D.M. 1992. Developmental changes in endogenous retinoids during pregnancy and embryogenesis in the mouse. *Biol. Reprod.* 46 (5): 802-810.

Schuytema, G.S. et Nebeker, A. 1999. Comparative toxicity of ammonium and nitrate compounds to Pacific treefrog and African clawed frog tadpoles. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2251-2257.

Scotum, D.L. 2000. Frog limb deformities: An eco-devo riddle wrapped in multiple hypotheses surrounded by insufficient data. *Teratol.* 62: 147-150.

- Semba, R.D. 1994. Vitamin A, immunity, and infection. *Clin. Infect. Dis.* 19: 489-499.
- Sheffield, S.R. et Lochmiller, R.L. 2001. Effects of field exposure to diazinon on small mammals inhabiting a semienclosed prairie grassland ecosystem. I. Ecological and reproductive effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 284-296.
- Shidoji, Y. et Muto, Y. 1977. Vitamin A transport in plasma of the non-mammalian vertebrates: isolation and partial characterization of piscine retinol-binding protein. *J. Lipid Res.* 18: 679-691.
- Siebert, P.D. et Chenchik, A. 1993. Modified acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform RNA extraction method which greatly reduces DNA contamination. *Nucl. Acids Res.* 21: 2019-2020.
- Simms, W. et Ross, P.S. 2000a. Developmental changes in circulatory vitamin A (retinol) and its transport proteins in free-ranging harbour seal (*Phoca vitulina*) pups. *Can. J. Zoolog.* 78: 1862-1868.
- Simms, W. et Ross, P.S. 2000b. Vitamin A physiology and its application as a biomarker of contaminant-related toxicity in marine mammals: a review. *Toxicol. Ind. Health.* 16: 291-302.
- Skaare, J.U., Bernhoft, A., Wiig, O., Norum, K.R., Haug, E. Eide, D.M. et Derocher, A.E. 2001. Relationship between plasma levels of organochlorines, retinol, and thyroid hormones from polar bears (*Ursus maritimus*). *J. Toxicol. Env. Heal. A.* 62: 227-241.
- Skrypina, N.A., Timofeeva, A.V., Khaspekov, G.L., Savochkina, L.P. et Beabealashvili, R.S. 2003. Total RNA suitable for molecular biology analysis. *J. Biotechnol.* 105: 1-9.
- Smith, J.W., Evans, A.T., Costall, B. et Smythe, J.W. 2002. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neurosci. Biobehav. R.* 26 (1): 45-60.
- Smith, F.R. et Goodman, D.S. 1971. The effects of diseases in the liver, thyroid, and kidneys on the transport of vitamin A in human plasma. *J. Clin. Invest.* 50 (11): 2426-2436.
- Soprano, D.R. et Blaner, W.S. 1994. Plasma retinol-binding protein. In *The retinoids: Biology, Chemistry and medicine*. M. B. Sporn, Roberts, A.B. et Goodman, D.S. New York. 679 pp.

Soprano, D.R., Smith, J.E. et Goodman D.S. 1982. Effect of retinol status on retinol-binding protein biosynthesis rate and translatable messenger RNA level in rat liver. *J. Biol. Chem.* 257: 7693-7697.

Sparling, D.W., Fellers, G. et McConnel, L. 2001. Pesticides are involved with population declines of amphibians in the California Sierra Nevadas. *Scientif. World J.* 1: 200-201.

Spear, P.A., Boily, M.H., Giroux, I., Deblois, C., Leclair, M.H., Levasseur, M. et Leclair, R. 2009. Study design, water quality, morphometrics and age of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in sub-watersheds of the Yamaska River drainage basin, Quebec, Canada. *Aquat. Toxicol.* 91: 110-117.

Spear, P.A. et Bourbonnais, D.H. 2000. Use of retinoids as biomarkers. In *Use of biomarkers for environmental quality assessment*, edited by L. Lagadic, Caquet, T., Amiard, J.-C. and Ramade, F. Enfield, USA.

Spear, P.A. et Moon, T.W. 1986. Thyroid-vitamin A interactions in chicks exposed to 3,4,3,4-tetrachlorobiphenyl: Influence of low dietary vitamin A and iodine. *Environ. Res.* 40:188-198.

Sporn, M.B., Roberts, A.B. et Goodman, D.S. 1994. *The retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*. M. B. Sporn, Roberts, A.B. et Goodman, D.S. New York. 679 pp.

Stallard, R.F. 2001. Possible environmental factors underlying amphibian decline in Easter Puerto Rico: Analysis of U.S. government data archives. *Conserv. Biol.* 15: 943-953.

Steel, L.F., Trotter, M.G., Nakajima, P.B., Mattu, T.S., Gonye, G. et Block, T. 2003. Efficient and specific removal of albumin from human serum samples. *Mol. Cell. Proteomics.* 2: 262-270.

Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fishman, D.L. et Waller, R.W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science.* 306: 1783-1786.

Sucov, H.M., Dyson, E., Gumeringer, E.L., Price, J., Chien, K.R. et Evans, R.M. 1994. RXR α mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signalling in heart morphogenesis. *Gene. Dev.* 8: 1007-1018.

Sucov, H.M. et Evans, R.M. 1995. Retinoic acid and retinoic acid receptors in development. *Mol. Neurobiol.* 10: 169-184.

Sundaram, M., Sivaprasadarao, A., DeSousa, M.M. et Findlay, J.B. 1998. The transfer of retinol from serum retinol-binding protein to cellular retinol-binding protein is mediated by a membrane receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 3336-3342.

Takacs, P., Martin, P.A. et Struger, J. 2002. Pesticides in Ontario: a critical assessment of potential toxicity of agricultural products to wildlife, with consideration for endocrine disruption. Volume 2: Triazine herbicides, glyphosate and metolachlor. Service canadien de la faune. 111 pp.

Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M., Cyr, D. et Marcogliese, D. 2002. Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 527-531.

Taylor, B., Skelly, D., Demarchis, L.K., Slade, M.D., Galusha, D. et Rabinowitz, P.M. 2005. Proximity to pollution sources and risk of amphibian limb malformations. *Environ. Health. Persp.* 113: 1497-1501.

Tellier, S. 2006. Les pesticides en milieu agricole: état de la situation environnementale et initiatives prometteuses. Direction des politiques en milieu terrestre, Service des pesticides, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs. ENVIRODOC ISBN-13 : 978-2-550-48224-6. 90 pp.

Thompson, K.L., Pine, P.S., Rosenzweig, B.A., Turpaz, Y. et Retief, J. 2007. Characterization of the effect of sample quality on high density oligonucleotide microarray data using progressively degraded rat liver RNA. *BMC Biotech.* 7: 1-12

Thurnham, D.I. et Northrop-Clewes, C.A. 1999. Optimal nutrition: Vitamin A and the carotenoids. *P. Nutr. Soc.* 58: 449-457.

Tornero, V., Borrell, A., Aguilar, A., Forcada, J. et Lockyers, C. 2006. Organochlorine contaminant and retinoid levels in blubber of common dolphins (*Delphinus delphis*) of northwestern Spain. *Environ. Pollut.* 140: 312-321.

Travis, J., Bowen, J., Tewksbury, D., Johnson, D. et Pannel, R. 1976. Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin-depleted plasma. *Biochem. J.* 157: 301-306.

Urbatzka, R., Bottero, S., Mandich, A., Lutz, I. et Kloas, W. 2007. Endocrine disrupters with (anti)estrogenic and (anti)androgenic modes of action affecting reproductive biology of *Xenopus laevis*: I. Effects on sex steroid levels and biomarker expression. *Comp. Biochem. Phys. C.* 144: 310-318.

Van Bennekum, A.M., Blaner, W.S., Seifert-Bock, I., Moukides, M., Brouwer, A. et Hendricks, H.F.J. 1993. Retinol uptake from retinol-binding protein (RBP) by liver parenchymal cells *in vitro* does not specifically depend on its binding to RBP. *Biochem.* 32: 1727-1733.

Van der Werf, H.M.G. 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agr. Environ.* 60: 81-96.

Waits, R.P., Yamada, T., Uemichi, T. et Benson, M.D. 1995. Low plasma concentrations of retinol-binding protein in individuals with mutations affecting position 84 of the transthyretin molecule. *Clin. Chem.* 41 (9): 1288-1291.

Wake, D. 1991. Declining amphibian populations. *Science* 253: 860.

Wald, G. 1968. The molecular basis of visual excitation. *Nature* 219: 800-807.

Wei, S., Episkopou, V., Piantedosi, R., Maeda, R., Shimada, S., Gaitanaris, G.A., Gottesman, M.E. et Robertson, E.J. 1995. Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination. *J. Biol. Chem.* 270: 866-870.

Williams, B.K. et Semlitsch, R.D. 2009. Larval responses of three Midwestern anurans to chronic, low-dose exposures of four herbicides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* DOI 10.1007/s00244-009-9390-z.

Withgott, J. 2002. Amphibian decline: Ubiquitous herbicide emasculate frogs. *Science.* 296: 447-448.

Wolf, G. 1984. Multiple functions of vitamin A. *Physiol. Rev.* 64: 873-937.

Woodford, J.E. et Meyer, E.W. 2003. Impact of lakeshore development on green frog abundance. *Biol. Conserv.* 110: 277-284.

Yamauchi, K., Ishihara, A., Fukazawa, H. et Terao, Y. 2003. Competitive interactions of chlorinated phenol compounds with 3,3',5-triiodothyronine binding to transthyretin: Detection of possible thyroid-disrupting chemicals in environmental waste water. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 187: 110-117.

Yamauchi, K., Takeuchi, H.A., Overall, M., Dziadek, M., Munro, S.L.A. et Schreiber, G. 1998. Structural characteristics of bullfrog (*Rana catesbeiana*) transthyretin and its cDNA: comparison of its pattern of expression during metamorphosis with that of lipocalin. *Eur. J. Biochem.* 256: 287-296.

Zapponi, M.C., Zanotti, G., Stoppini, M. et Berni, R. 1992. The primary structure of piscine (*Oncorhynchus mykiss*) retinol-binding protein and comparison with the three-dimensional structure of mammalian retinol-binding protein. *Eur. J. Biochem.* 210: 937-943.

Zile, M.H. 1998. Vitamin A and embryonic development: An overview. *J. Nutr.* 128: 455S-458S.

Zile, M.H. 2001. Function of vitamin A in vertebrate embryonic development. *J. Nutr.* 131: 705-708.

ANNEXE

RÉSULTATS DÉTAILLÉS DES ANALYSES D'EAU

Tableau A.1 : Résultats des analyses d'eau de 2007 pour les paramètres physico-chimiques. Les échantillons ont été récoltés le 4 juillet 2007 aux sites DS (Deborah Stairs), LB (Lac Boivin), CHOI (réservoir choinière), YAM (rivière Yamaska), PAB (rivière Pot-au-beurre) et Noire (rivière Noire).

	DS	LB	CHOI	YAM	PAB	Noire	Limite de détection
pH	7,2	ND	ND	9,18	7,47	8,4	ND
Température (°C)	19,9	ND	ND	23,6	17,6	22,8	ND
Conductivité (µS)	318	ND	ND	536	523	605	ND
NO ₃ + NO ₂ (mg/l)	0,019	ND	ND	0,6	0,54	0,71	0,007
NO ₂ (mg/l)	0,009	ND	ND	0,6	ND	0,1	0,002
NO ₃ (mg/l)	0,01	ND	ND	<0,005	ND	0,61	0,005
P total(mg/l)	0,015	ND	ND	0,12	0,14	0,13	0,01
COD(mg/l)	7,6	ND	ND	7,9	11,4	7,3	0,2
Turbidité(UTN)	4,6	ND	ND	12	48	4,4	0,1

Tableau A.2 : Résultats des analyses d'eau de 2008 pour les paramètres physico-chimiques. Les échantillons ont été récoltés le 7 juillet 2008 aux sites DS (Deborah Stairs), LB (Lac Boivin), CHOI (réservoir choinière), YAM (rivière Yamaska), PAB (rivière Pot-au-Beurre) et Noire (rivière Noire).

	DS	LB	CHOI	YAM	PAB	Noire	Limite de détection
pH	7,73	9,46	8,28	8,52	ND	8,14	ND
Température (°C)	22,5	24,1	23,8	25,2	ND	24,7	ND
Conductivité (µS)	136	198	132	276	ND	214	ND
NO ₃ + NO ₂ (mg/l)	0,006	0,006	0,686	3,716	1,934	5,430	0,006
NO ₂ (mg/l)	<0,0006	<0,0006	0,006	0,016	0,034	0,03	0,0006
NO ₃ (mg/l)	<0,005	<0,005	0,68	3,7	1,9	5,4	0,005
P total (mg/l)	0,019	0,15	0,013	0,048	0,091	0,081	0,01
COD (mg/l)	ND	ND	ND	ND	11	ND	0,2
Turbidité (mg/l)	9	10	8	10	ND	10	0,1

Tableau A.3 : Résultats des analyses pour les pesticides dans l'eau échantillonnée le 4 juillet 2007 à chacun des sites. Les chiffres en caractères maigres représentent la limite de détection alors que les chiffres en caractère gras indiquent un dépassement de cette limite.

	Deborah Stairs	Lac Boivin	Réservoir Choinière	Rivière Pot-au-Beurre	Rivière Yamaska	Rivière Noire
Clopyralide	0.03	ND	ND	0.03	0.03	0.03
Dicamba	0.03	ND	ND	0.03	0.03	0.07
Mécoprop	0.01	ND	ND	0.01	0.01	0.01
MCPA	0.01	ND	ND	0.01	0.01	0.02
Dichlorprop	0.03	ND	ND	0.03	0.03	0.03
2,4-D	0.02	ND	ND	0.02	0.02	0.02
Bromoxynil	0.02	ND	ND	0.02	0.02	0.02
Triclopyr	0.02	ND	ND	0.02	0.02	0.02
Fénoprop (Silvex)	0.01	ND	ND	0.01	0.01	0.01
MCPB	0.01	ND	ND	0.01	0.01	0.01
2,4,5-T	0.01	ND	ND	0.01	0.01	0.01
2,4-DB	0.02	ND	ND	0.02	0.02	0.02
Bentazone	0.04	ND	ND	0.04	0.04	0.08
Piclorame	0.02	ND	ND	0.02	0.02	0.02
Dinosébe	0.04	ND	ND	0.04	0.04	0.04
Diclofop-méthyl	0.02	ND	ND	0.02	0.02	0.02
Dichlorvos	0.02	ND	ND	0.02	0.02	0.02
Diuron	0.24	ND	ND	0.24	0.24	0.24
EPTC	0.02	ND	ND	0.02	0.02	0.02
Butilate	0.02	ND	ND	0.02	0.02	0.02
Mévinphos	0.03	ND	ND	0.03	0.03	0.03
Tébutiuron	0.29	ND	ND	0.29	0.29	0.29
Désisopropyl-atrazine	0.03	ND	ND	0.03	0.03	0.08
Dééthyl-atrazine	0.03	ND	ND	0.03	0.04	0.19
Trifluraline	0.02	ND	ND	0.02	0.02	0.02
Phorate	0.03	ND	ND	0.03	0.03	0.03
Diméthoate	0.04	ND	ND	0.04	0.04	0.04
Simazine	0.02	ND	ND	0.02	0.02	0.02
Carbofuran	0.09	ND	ND	0.09	0.09	0.09
Atrazine	0.02	ND	ND	0.15	0.17	0.91
Terbufos	0.05	ND	ND	0.05	0.05	0.05
Fonofos	0.01	ND	ND	0.01	0.01	0.01
Diazinon	0.02	ND	ND	0.02	0.02	0.02
Disulfoton	0.03	ND	ND	0.03	0.03	0.03
Chlorothalonil	0.05	ND	ND	0.05	0.05	0.05
Métribuzine	0.02	ND	ND	0.02	0.02	0.02
Parathion-méthyl	0.03	ND	ND	0.03	0.03	0.03
Carbaryl	0.07	ND	ND	0.07	0.07	0.07
Chloroxuron	0.13	ND	ND	0.13	0.13	0.13
Fénitrothion	0.03	ND	ND	0.03	0.03	0.03
Linuron	0.07	ND	ND	0.07	0.07	0.07
Malathion	0.02	ND	ND	0.02	0.02	0.02
Métoalachlore	0.02	ND	ND	0.03	0.06	0.29
Chlorpyrifos	0.03	ND	ND	0.03	0.02	0.03
Parathion	0.02	ND	ND	0.02	0.16	0.02
Cyanazine	0.05	ND	ND	0.05	0.03	0.05
Chlorfenvinphos	0.05	ND	ND	0.05	0.06	0.05
Myclobutanil	0.05	ND	ND	0.05	0.02	0.05
Azinphos-méthyl	0.20	ND	ND	0.20	0.22	0.20
Phosalone	0.04	ND	ND	0.04	0.03	0.04
Diméthénamide	0.03	ND	ND	0.03	0.02	0.06
Méthidathion	0.02	ND	ND	0.02	0.02	0.02
1-naphtol	0.03	ND	ND	0.03	0.06	0.03
Bendiocarbe	0.05	ND	ND	0.05	0.01	0.05

Tableau A.4 : Résultats des analyses pour les pesticides dans l'eau échantillonnée le 7 juillet 2008 à chacun des sites. Les chiffres en caractères maigres représentent la limite de détection alors que les chiffres en caractère gras indiquent un dépassement de cette limite.

	Deborah Stairs	Lac Boivin	Réservoir Choinière	Rivière Pot- au-Beure	Rivière Yamaska	Rivière Noire
Clopyralide	0.03	0.03	0.03	ND	0.03	0.03
Dicamba	0.03	0.03	0.03	ND	0.05	0.04
Mécoprop	0.01	0.01	0.01	ND	0.01	0.01
MCPA	0.01	0.01	0.01	ND	0.01	0.05
Dichlorprop	0.03	0.03	0.03	ND	0.03	0.03
2,4-D	0.02	0.02	0.02	ND	0.02	0.02
Bromoxynil	0.02	0.02	0.02	ND	0.02	0.02
Triclopyr	0.02	0.02	0.02	ND	0.02	0.02
Fénoprop (Silvex)	0.01	0.01	0.01	ND	0.01	0.01
MCPB	0.01	0.01	0.01	ND	0.01	0.01
2,4,5-T	0.01	0.01	0.01	ND	0.01	0.01
2,4-DB	0.02	0.02	0.02	ND	0.02	0.02
Bentazone	0.04	0.04	0.04	ND	0.04	0.09
Piclorame	0.02	0.02	0.02	ND	0.02	0.02
Dinosébe	0.04	0.04	0.04	ND	0.04	0.04
Diclofop-méthyl	0.02	0.02	0.02	ND	0.02	0.02
Dichlorvos	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Diuron	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
EPTC	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Butilate	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Mévinphos	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Tébutiuron	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29
Désisopropyl-atrazine	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Dééthyl-atrazine	0.04	0.03	0.03	0.10	0.03	0.12
Trifluraline	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Phorate	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Diméthoate	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Simazine	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Carbofuran	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
Atrazine	0.02	0.06	0.15	0.29	0.15	0.61
Terbufos	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Fonofos	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Diazinon	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Disulfoton	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Chlorothalonil	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Métribuzine	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Parathion-méthyl	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Carbaryl	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
Chloroxuron	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Fénitrothion	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Linuron	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
Malathion	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Métolachlore	0.02	0.01	0.08	0.19	0.05	0.11
Chlorpyrifos	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Parathion	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Cyanazine	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Chlorfenvinphos	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Myclobutanil	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Azinphos-méthyl	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Phosalone	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Diméthénamide	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Méthidathion	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
1-naphtol	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Bendiocarbe	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Glyphosate	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.22
AMPA	0.20	0.20	0.20	0.20	1.4	0.20